

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimmer

**Zum Wirkungsmechanismus von Phalloidin
an isolierten Leberzellmembranen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Volker Eckermann
Tierarzt aus Kassel

Gießen 1970

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
an der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. med. M. Frimmer

**Zum Wirkungsmechanismus von Phalloidin
an isolierten Leberzellmembranen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Volker Eckermann
Tierarzt aus Kassel

Gießen 1970

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
in Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. vet. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Frimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1970



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	5
Problemstellung	11
Methoden	12
Material	18
Ergebnisse	
I. Versuche zur Isolierung von Plasma- membranen	19
II. Einfluß von Phalloidin auf Trans- port-ATPasen	24
III. Elektronenmikroskopische Untersu- chungen	27
IV. Analytische Daten lipidfreier Plas- mamembransubstanzen	27
V. Versuche zur Bindung von Phalloidin an Plasmamembranbestandteile	
A. Bindung an Plasmamembranlipidex- trakt	29
B. Bindung an nichtlipidhaltige Plasmamembranbestandteile	34
C. Differenzspektren von Phalloidin mit nichtlipidhaltigen Plasmamem- branbestandteilen	36
Diskussion	54
Zusammenfassung	58
Literaturverzeichnis	59
Lebenslauf	68



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545904_0006

Einleitung

Der grüne Knollenblätterpilz, *Amanita phalloides*, ist eine der giftigsten Pflanzen der Wälder Mitteleuropas. Seine Giftstoffe kennt man seit über 30 Jahren. Schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurde versucht, die Inhaltsstoffe zu isolieren und zu charakterisieren (G. Paulet, 1908). 1938 gelang es Lynen und Wieland eines der Haupttoxine des Pilzes, das Phalloidin, zu isolieren und chemisch zu identifizieren (F. Lynen u. U. Wieland, 1938). Weiterhin fanden Th. und U. Wieland, daß mehrere Gifte im grünen Knollenblätterpilz vorkommen (Th. Wieland u. U. Wieland, 1938). Nach der chemischen Konstitution und der Wirkungsweise kann man die Knollenblätterpilzgifte in verschiedene Gruppen einteilen:

1. die Phallotoxine (Phalloine) mit dem Hauptvertreter Phalloidin, dem Phalloin, Phallacidin, Phallasin und dem Phallin B;
2. die Amatoxine mit dem α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Amanitin und dem Amanin;
3. ungiftige Peptide: Phallin A, Amanullin und Antamanid (Th. Wieland, 1968).

Die Vertreter der ersten Gruppe sind zyklische Heptapeptide, bei denen die SH-Gruppe des Cysteins mit dem Indolkern des Tryptophans über eine Merkaptidbindung den zyklischen Ring ausfüllt.

Die zweite Gruppe ist chemisch durch eine zyklische Oktapeptidstruktur charakterisiert. Hier verbindet eine Sulfoxidbrücke Cystein mit dem Indolkern eines Tryptophans.

Das Antamanid ist im Gegensatz zu den anderen Amatoxinen ein aus L-Aminosäuren aufgebautes zyklisches Dekapeptid. In neuerer Zeit wurde festgestellt, daß das Antamanid als kompetitiver Hemmstoff von Phalloidin wirksam ist (Th. Wieland et al., 1968).

Auch in Wirkungsweise und Angriffspunkt unterscheiden sich die Phallotoxine und Amatoxine (L. Fiume u. R. Laschi, 1965; F. Stirpe u. L. Fiume, 1966; S.T. Jacob, 1970).

Schon geringe Mengen der Inhaltsstoffe des Pilzes führen zu einer Zerstörung der Leber. Die Giftmenge eines einzigen Pilzes kann zwei bis drei Menschen töten.

Das klinische Bild ist durch Erbrechen, Durchfälle, meningitische Symptome und leichte Benommenheit gekennzeichnet und wird in den ersten 24 Stunden von einer mäßigen Leberschwellung begleitet. Am zweiten und dritten Tag kommt es zu einer erheblichen Lebervergrößerung, danach nimmt die Schwellung wieder ab (H. Münch, 1965).

Seit mehr als 30 Jahren wurde versucht, mit histologischen, elektronenmikroskopischen und biochemisch-pharmakologischen Methoden den Wirkungsmechanismus der Phalloidinvergiftung zu klären.

Das histologische Bild der Phalloidinvergiftung wird durch eine schwere, haemorrhagische Leberdystrophie bestimmt. Die großvacuolären, fettnegativen Auflockerungen des Zytoplasmas beginnen acino-peripher und dringen zwei Stunden nach der Vergiftung bis zum Zentrum vor.

Die Nekrose vereinzelter Parenchymzellen und fleckförmige Blutungen dringen im Gefolge der großvacuolären Degeneration ebenfalls bis ins Zentralgebiet vor (F. Matschinsky, U. Meyer u. O. Wieland, 1960).

Die elektronenmikroskopischen Befunde der Phalloidinvergiftung stimmen mit den histologischen Beobachtungen überein (F. Miller u. O. Wieland, 1967).

Die ersten Abweichungen vom normalen Bau der Leberzellen betreffen das endoplasmatische Retikulum; es entstehen stellenweise kleine Vacuolen. Eine Dilatation der Zellmembran wird nicht beobachtet.

Das Glykogen schwindet mit zunehmender Vergiftungsdauer in denjenigen Zellen, in denen Vacuolen und Nekrosen auftreten.

Wenig später entstehen dann durch Zytoplasmabrücken getrennte oder gekammerte Vacuolen. Die begrenzende Membran ist nicht von Ribosomen besetzt und zeigt stellenweise dreischichtigen Bau. Anzahl und Größe

der Vacuolen nehmen mit Dauer der Vergiftung zu. Autolytische Vacuolen sind ebenfalls häufiger zu finden als in unbehandelter Leber. Die in normalen Lebern regelmäßig vorkommenden peribilären Körper (sekundäre Lysosomen) sind nach Phalloidinvergiftung nicht verändert oder vermehrt und zeigen keine bevorzugte Lage in der Umgebung der Nekroseherde oder der autolytischen Vacuolen. Ebenso treten an Kernen, Nucleoli und Mitochondrien in allen untersuchten Stadien der akuten Vergiftung (100 Minuten nach Giftgabe) keine morphologischen Veränderungen auf.

Die histologischen und elektronenmikroskopischen Befunde geben keinen Hinweis zum Wirkungsmechanismus des Phalloidins.

Die Schädigung der Leber mit Phalloidin oder dem Gesamtextrakt des Giftpilzes führt zu einer beträchtlichen Störung des Kohlehydratstoffwechsels (Th. Wieland u. K. Dose, 1954). Zwei Stunden nach der Phalloidinvergiftung setzt eine Verarmung der Leber an Glykogen ein, dessen Gehalt bis auf ein Prozent der physiologischen Werte abnimmt.

Aufgrund seiner Untersuchungen deutete Wieland später diesen Glykogenverlust als Hemmung der Glykogensynthese durch die Phalloidineinwirkung (O. Wieland, 1965). Der Blutzuckerwert des Serums bei Ratten sinkt im Laufe der Vergiftung ab. Ebenso wird ein langsam einsetzender Rückgang des Proteingehaltes des Blutserums nachgewiesen. Diese Beobachtung bezieht sich vorwiegend auf das Albumin.

Die Verminderung des Serumproteins wurde von Wieland und Dose zunächst als eine Hemmung der Blutproteinsynthese gedeutet (Th. Wieland u. K. Dose, 1954). Spätere Untersuchungen von v.d.Decken und Mitarbeitern unterstützten diese Hypothese (A. v.d.Decken et al., 1960). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wieland und Dose beobachteten Matschinsky und Wieland beim Kaninchen eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels (F. Matschinsky u. O. Wieland, 1960). Die Untersucher fanden nach fünfstündiger Phalloidinvergiftung eine Vermehrung

des anorganischen Phosphates und es trat gleichzeitig eine gewaltige Blutzuckersteigerung im Serum auf. Ebenso stieg der Harnsäurespiegel an. Im Laufe der Vergiftung kommt es auch zu einem Sistieren des Galleflusses. Bei den vorgenannten Beobachtungen ergab sich kein Hinweis auf den primären Wirkungsort des Phalloidins. Eines der ersten meßbaren Ereignisse, das von Wieland und Dose nachgewiesen wurde, war eine erhebliche Senkung der ATP-Konzentration der Leber, die mit dem Zeitpunkt der Hemmung der Glykogensynthese (etwa acht Stunden nach Vergiftung) zusammenfällt. Die Erniedrigung der ATP-Konzentration muß eine Stagnation biosynthetischer Prozesse zur Folge haben (Th. Wieland u. K. Dose, 1956). Die Befunde führten zu der Annahme, daß durch die Vergiftung eine vermehrte Hydrolyse von ATP und ADP stattfindet. Ebenso wurde auch eine Verminderung des NAD-Spiegels festgestellt, der sechs Stunden nach Vergiftungsbeginn um die Hälfte verringert war (Th. Wieland u. K. Dose, 1956).

Da gleichzeitig mitochondriale Enzyme (β -Ketothiolase, β -Hydoxyacyldehydrogenase und Citrat-kondensierende Enzyme) im Serum auftraten, die normalerweise dort nicht nachweisbar sind, wurde zunächst die Wirkung des Phalloidins in einer Schädigung der Mitochondrien vermutet. Isolierte Mitochondrien aus phalloidinvergifteten Rattenlebern zeigten eine erhöhte Mg^{++} -ATPase-Aktivität, die durch Glutaminat und Succinat teilweise hemmbar war (F. Matschinsky u. O. Wieland, 1960). In vitro Versuche mit isolierten Mitochondrien ergaben, daß Phalloidin keinen Einfluß auf Transport-ATPasen besitzt.

Die Annahme der Adenosinpolyphosphate einerseits, sowie die Zunahme des anorganischen Phosphates andererseits, ließen vermuten, daß Phalloidin einen Einfluß auf die oxydative Phosphorylierung haben könnte. Nach Befunden von Hess nimmt unter der Phalloidineinwirkung die Bildung von ATP bei gleichbleibendem Sauerstoffverbrauch ab. In Konzentrationen von $10^{-5}M$ Phalloidin fand er eine halbmaximale Hemmung der oxydativen Phosphorylierung (B. Hess, 1956).

Die Frage, ob Phalloidin in vivo primär eine Mitochon-

drienschädigung der Leber bewirkt, konnte damit nicht eindeutig geklärt werden, da spezifische Entkoppler (z.B. 2-4-Dinitrophenol) der oxydativen Phosphorylierung keineswegs die Wirkung von Phalloidin simulieren können.

Die bei der Phalloidinvergiftung beobachteten regressiven und autolytischen Veränderungen der Leber ließen vermuten, daß Phalloidin lysosomale Hydrolasen durch eine Zerstörung lysosomaler Membranen freisetzt (O. Wieland, 1965).

An der isoliert perfundierten Rattenleber kommt es 20 Minuten nach Phalloidingaben zur Freisetzung lysosomaler Hydrolasen ins Perfusionsmedium. Dieser Befund schien zunächst eine Bestätigung der Vermutung von Wieland zu sein. Weitere Untersuchungen dazu zeigten, daß selbst hohe Dosen Phalloidin an isolierten Lysosomen verschiedener Herkunft keinen Einfluß auf die Freisetzung lysosomaler Enzyme besitzen (M. Frimmer et al., 1967).

Da zu einem frühen Zeitpunkt die Freisetzung lysosomaler Hydrolasen an der isoliert perfundierten Rattenleber gemessen werden kann, ließ dieser Befund zunächst darauf schließen, daß Phalloidin zu einem die Lysosomenmembran schädigenden Metaboliten giftet wird.

Alle Versuche in vitro, durch Phalloidin unter Zugabe von subzellulären Fraktionen (Mikrosomen, Plasma- und Zellkernfraktionen) in hydroxylierenden Ansätzen die Lysosomenmembran zu schädigen, verliefen negativ (M. Frimmer et al., 1967).

An der isoliert perfundierten Rattenleber kann als erstes, mit chemischen Methoden meßbares Kriterium der Phalloidinvergiftung ein Kaliumverlust der Leber festgestellt werden (M. Frimmer et al., 1967).

Ein rascher Kaliumanstieg konnte noch vor dem Auftreten lysosomaler Hydrolasen im Perfusat gemessen werden. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, daß Phalloidin primär die Permeabilität der Plasmamembran für Kalium erhöht. Einen weiteren Hinweis gaben Untersuchungen mit ^3H -Desmethylphalloin (M. Frimmer et al., 1969).

An der isoliert perfundierten Rattenleber bindet sich das ^3H -Desmethylphalloin unmittelbar nach der Gabe an die Zellmembran. Erst zu einem späteren Zeitpunkt kann es dann an der Mikrosomenfraktion nachgewiesen werden. Versuche mit isolierten Plasmamembran-, Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen ergaben, daß Phalloidin gegenüber der Plasmamembran die größte Affinität besitzt (M. Frimmer et al., 1969).

Auch elektronenoptische Untersuchungen haben gezeigt, daß bereits 20 Minuten nach der Giftgabe die Leberzellgrenzen nicht mehr einwandfrei dargestellt werden können (M. Frimmer et al., 1967).

Die Bindung von Phalloidin an die Plasmamembran ist ein weitgehend temperaturabhängiger Vorgang. Bei niedrigen Temperaturen war Phalloidin unwirksam (J. Gries, M. Frimmer, D. Hegner u. H. Glossmann, 1968).

Eine weitere Bestätigung, daß der primäre Angriffspunkt des Phalloidins die äußere Zellmembran sein muß und daß das Phalloidin den Kaliumefflux erhöht, lieferten Untersuchungen mit Tetraäthylammonium (TEA^+). Diese Substanz wird von Elektrophysiologen zur spezifischen Blockade des Kaliumkanals von konduktiven Membranen verwendet (B. Hille, 1967; R.L. Parsons, 1969). Der durch Phalloidin verursachte Kaliumverlust kann durch kleine, in der Größenordnung der Phalloidindosis liegende Konzentrationen an TEA^+ verhindert oder gestoppt werden (M. Frimmer u. G. Weil, 1969).

Der erhöhte Kaliumaustritt ins Perfusionsmedium kann durch einige als Leberschutzstoffe bekannte Pharmaka vermindert werden. Hierbei wurden einige Choleretika, Hormone und "schwefelhaltige Verbindungen" auf ihre Schutzwirkung an der isoliert perfundierten, phalloidinvergifteten Rattenleber untersucht (M. Frimmer et al., 1968). Die Wirksamkeit der SH-Verbindungen deutet darauf hin, daß bei der Phalloidinvergiftung schwefelhaltige Membranstrukturen am molekularen Mechanismus beteiligt sein müssen.

Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Hinweise auf den primären Bindungsort von Phalloidin erarbeitet werden. Dazu mußten folgende Fragen behandelt werden:

1. Voraussetzung für die Durchführung der Untersuchungen war die Darstellung von Leberzellmembranen unter enzymatischer und elektronenmikroskopischer Kontrolle.
2. Es sollte die Einwirkung von Phalloidin auf Enzyme des aktiven Kationentransportes untersucht werden
 - a) p-Nitrophenylphosphatasen
 - b) ATPasen.
3. Zur Aufklärung des Bindungsortes war eine Trennung von Lipiden und Proteinen aus Leberzellmembranen erforderlich. Versuche zur Bindung von Phalloidin sollten
 - a) an der Lipidfraktion und
 - b) an nichtlipidhaltigen Bestandteilen durchgeführt werden.
4. Die nichtlipidhaltige Membranfraktion sollte elektronenmikroskopisch und chemisch-analytisch charakterisiert werden.

Methoden

1. Versuchstiere

Die Lebern von 180 bis 220 g schweren Wistarratten wurden zur Isolierung von Plasmamembranen verwendet. Die Ratten wurden bis 18 Stunden vor der Tötung mit Altromin-Standarddiät gefüttert und getränkt.

II. Präparative Methoden

A. Isolierung von Plasmamembranen in Anlehnung an die Methode nach Coleman

Im Gegensatz zu Coleman perfundierten wir die Rattenlebern durch die Vena portae und injizierten vorher 500 I.E. Heparin in die Vena femoralis (R. Coleman et al., 1967). Die Originalmethode wurde bei der ersten Präparation nicht verändert.

Bei der zweiten Präparation änderten wir nur die Schichtung und das Volumen der Saccharosedichtegradienten, über die die Membransuspension gelagert wurde:

d: 1,16 - 20 ml, d: 1,18 - 12 ml, d: 1,2025 - 8 ml.

Nach diesem Präparationsverfahren bleibt die Ausbeute gering. Wir änderten deshalb die Methode nach Coleman schrittweise ab.

Vorversuche zeigten, wie im Interesse einer Steigerung der Ausbeute am günstigsten weiter präpariert werden muß.

Aus Abbildung 1 geht hervor:

1. die prozentuale Verteilung der Leitenzyme zeigt, daß im ersten Homogenisationsschritt neun Hübe günstige Bedingungen schaffen, da Mikrosomen (Glucose-6-phosphatase) und Lysosomen (saure Phosphatase) nach der Sedimentation bei 2000 x g im Überstand bleiben. Plasmamembranen (5'-Nucleotidase) können zu 50% im Sediment gewonnen werden.

Die Variation der g-Zahl im ersten Homogenisations-

schritt ergibt, daß eine Erhöhung oder Erniedrigung die Ausbeute nicht wesentlich steigert. Bei 2000 x g wird viel Membranausbeute im Sediment gefunden, bei geringem Anteil an Lysosomen und Mikrosomen.

2. Der zweite Homogenisationsschritt ergibt bei 15 oder 20 Hüben eine größere Membrananreicherung als bei zehn Hüben.

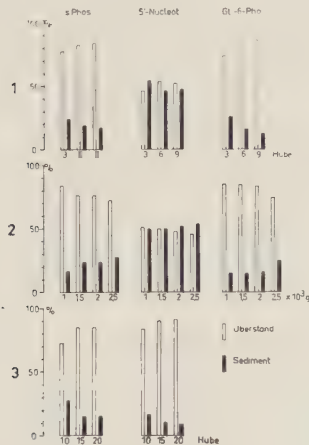


Abb. 1: Darstellung der Prozentverteilung der Leitenzyme, Vorversuche:

- 1 - Änderung der Hubzahlen beim ersten Homogenisationsschritt
- 2 - Änderung der Zentrifugation beim ersten Homogenisationsschritt
- 3 - Änderung der Hubzahlen beim zweiten Homogenisationsschritt

Die weiteren Präparationen werden aufgrund dieser Versuche von der Originalmethode wie folgt abgeändert:

Das Gesamthomogenat wird im Elvehjem-Teflon-Glas-Potter (radiale Weite 0,34 mm) mit neun Hüben homogenisiert und anschließend zehn Minuten bei 2000 x g

zentrifugiert. Der dreimal gewaschene Niederschlag wird im engen Homogenisator (radiale Weite 0,18 mm) mit 15 Hüben homogenisiert.

B. Dialyse von Membranen

Rattenleberzellmembranen wurden isoliert und aus Saccharoselösung der Dichte $d: 1,13$ und $d: 1,16$ entnommen.

Die Präparation von Membranprotein erfolgte mit zwei verschiedenen Verfahren:

1. Unmittelbar nach der Entnahme der Membranfraktion ($d: 1,13$ und $d: 1,16$) erfolgte eine Dialyse über 24 Stunden bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ gegen entionisiertes Wasser. Dabei wurde die Membranfraktion mit der zehnfachen Menge Aqua dest. verdünnt.
2. Für einen Teil der Versuche wurde die Membranfraktion nach der Verdünnung mit Aqua dest. 30 Minuten bei $20\,000 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und der Niederschlag mit der zehnfachen Aqua dest.-Menge aufgenommen und wie unter 1. dialysiert.

Die dialysierten Membransuspensionen wurden 30 Minuten bei $20\,000 \times g$ zentrifugiert, die Überstände wurden eingefroren und lyophilisiert.

Das noch saccharosehaltige Lyophilisat der ersten Präparation wird in den folgenden Versuchen L_1 , das nach dem zweiten Verfahren gewonnene L_2 bezeichnet.

C. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopische Kontrolle wurden die Membransuspensionen ($d: 1,13$ und $d: 1,16$) bei $15\,000 \times g$ sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 5%igem Glutaraldehyd in 0,1 m Cacodylatpuffer zwei Stunden fixiert. Abschließend erfolgte die Kontrastierung des Sedimentpfropfes in 1%iger gepufferter Osmiumsäure $(\text{OsO}_4)_{\text{pH } 7,4}$. Das so behandelte Sediment wurde mit 1%igem Uranylacetat nachkontrastiert und in Vestopal eingebettet. Die Dünnschnitte wurden im Zeiss-

Elektronenmikroskop EM 9 untersucht.
Frisch präparierte Membranen (d: 1,13) wurden für Versuche in vitro mit Phalloidin in 0,15 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4 inkubiert und nach dem Verfahren von Reale und Luciano durch "negativ-staining" kontrastiert und im Elektronenmikroskop untersucht (E. Reale u. L. Luciano, 1967).

D. Lipidextraktion

Die Lipide aus Plasmamembranfraktionen (d: 1,13 und d: 1,16) wurden nach der Methode von Folch extrahiert (J. Folch et al., 1957).

III. Enzymanalytische Methoden

A. Es wurden Membranfraktionen analysiert, die bei -20°C eingefroren waren.

Das freie anorganische Phosphat der folgenden Enzymbestimmungen wurde nach Bruce und Dubin gemessen (N.A. Bruce u. D.T. Dubin, 1960).

1. Enzyme der Plasmamembran:

1.1. Bestimmung der 5'-Nucleotidase (5'-Ribonucleotid-phosphohydrolase E.C. 3.1.3.5) nach Michell und Hawthorne (R.H. Michell u. J.N.Hawthorne, 1965);

1.2. NAD-spaltendes Enzym (NAD-Nucleosidase bzw. Pyrophosphatase) nach Lansing (H.J. Lansing et al., 1967);

1.3. Neutrale und alkalische p-Nitrophenylphosphatase nach Emmelot und Bos (P. Emmelot u. C.J.Bos, 1966);

1.4. $(\text{Na}^+ - \text{K}^+) - \text{ATPase}$ (ATP-phosphohydrolase E.C.3.6.1.3) und $\text{Mg}^{++} - \text{ATPase}$ (E.C.3.6.1.4) nach Emmelot und Bos (P. Emmelot u. C.J. Bos, 1966).

2. Bestimmung der sauren Phosphatase (E.C.3.1.1.3.1), ein Enzym der Lysosomenfraktion, nach Gianetto und De Duve (R. Gianetto u. C. De Duve, 1955).

3. Als Leitenzym der Mikrosomenfraktion wurde die

Glucose-6-phosphatase (E.C.3.1.3.9) nach Harper (A.E. Harper, 1962) bestimmt.

4. Bestimmung der Succinatdehydrogenase Succinat-2-(6-p-jodophenyl)-3(p-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumreduktase (E.C.1.3.99.1), ein Enzym der Mitochondrienfraktion, nach Pennington (R.J. Pennington, 1961).

B. Transport-ATPasen und Phalloidin

Membranen aus d: 1,13 wurden zu diesen Versuchen benutzt. Ein Teil wurde 12 bis 14 Stunden bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ gegen entionisiertes Wasser dialysiert, anschließend 30 Minuten bei $20\,000 \times g$ sedimentiert und mit Aqua dest. rehomogenisiert.

"Frische" Membranen (d: 1,13, nicht dialysiert) wurden 12 Stunden bei -20°C eingefroren, aufgetaut und im Versuch eingesetzt.

1. Die $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$ (E.C.3.6.1.3) wurde in einem Ansatz bestimmt, der 5 mM MgCl_2 , 20 mM KCl, 100 mM NaCl, 3 mM ATP und 150 mM Tris-HCl-Puffer $\text{pH } 7,4$ enthielt.

Für die $\text{Mg}^{++}\text{-aktivierbare ATPase}$ (E.C.3.6.1.4) wurde statt KCl und NaCl 150 mM Tris-HCl-Puffer $\text{pH } 7,4$ eingesetzt.

Zur Hemmung der $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$ wurde Quabain (g-Strophanthin) in einer Konzentration von 10^{-4} m verwendet.

2. Die $\text{K}^{+}\text{-aktivierte p-Nitrophenylphosphatase}$ wurde in einem Medium von 5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 2,5 mM Tris-HCl-Puffer ($\text{pH } 8,9$ und $7,4$) und 5 mM $\text{Na}_2\text{-p-Nitrophenylphosphat}$ bestimmt.

Phalloidin wurde in Konzentrationen von 20, 200 und $400\,\mu\text{g}$ pro mg Membranprotein an der $\text{Mg}^{++}\text{- und Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-Mg}^{++}\text{-ATPase}$ geprüft. Außerdem wurde die Wirkung des Phalloidins auf die neutrale und alkalische $\text{K}^{+}\text{- und Mg}^{++}\text{-aktivierte p-Nitrophenylphosphatase}$ bestimmt.

IV. Chemisch-analytische Methoden

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Membranfraktionen und Lyophilisate erfolgte nach der Methode von Folin, modifiziert nach Lowry (O. Folin u. V. Ciocalteu, 1927; O.H. Lowry et al., 1951).

Die Lyophilisate wurden nach folgenden Methoden charakterisiert:

1. Zuckerbestimmung (Orcin-Methode) nach Kabat und Mayers (E.A. Kabat u. M.M. Mayers, 1964);
2. Bestimmung von Aminosäuren (Ninhydrin-Reaktion) nach Moore und Stein (S. Moore u. W.H. Stein, 1954);
3. Neuraminsäurebestimmung (Resorcin-HCl-Methode) nach Svennerholm (L. Svennerholm, 1964);
4. Ribonucleinsäurebestimmung (Orcin-Methode) nach Bial, modifiziert nach Ceriotti (G. Ceriotti, 1955);
5. Desoxyribonucleinsäurebestimmung (Diphenylamin-Reaktion) nach Burton (K. Burton, 1955).

V. Physikalisch-chemische Methoden

A. Disk-Elektrophorese

80 mg L_2 wurden in Aqua dest. gelöst und die unlöslichen Bestandteile 10 Minuten bei 20 000 x g abzentrifugiert.

Die gelöste Fraktion wurde nach der Methode von Maurer (H.R. Maurer, 1968) in der Disk-Elektrophorese getrennt und mit Amidoschwarz angefärbt. Anschließend wurde das Ergebnis im "Beckman Analytrol mit vorgeschaltetem Scanning Attachment" photometrisch ausgewertet.

B. Versuche zum Nachweis einer Bindung von Phalloidin an Plasmalipidextrakt nach Folch.

Die methodischen Angaben zu diesen Versuchen sind bei den Ergebnissen zu finden.

VI. Optische Methoden

Spektren und Differenzspektren

Die Registrierungen wurden im Zeiss-Spektral-photometer PMQ II und im Cary-Recording-Spectrophotometer Nr. 14 durchgeführt.

(Nähere Angaben siehe Ergebnisse)

Material

Phalloidin: wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Th. Wieland, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Liquemin^R-Roche: S.A.F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz.

Rinderserumalbumin, 35%ige Lösung: Pentex, Kankakee (Illinois, USA).

Neuraminidase: Behring-Werke, Marburg/Lahn.

Acetyl-Neuraminsäure, Glutaraldehyd, DNS (Desoxyribonucleinsäure): Serva Heidelberg.

g-Strophantin (Ouabain), INT 2-(4-jodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenaltetrazoliumchlorid: Fluka AG, Buchs (Schweiz).

p-Chlormercuribenzoessäure, Na-Salz: Roth OHG, Karlsruhe.

Trypsin, NAD (β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid), ATP (Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz), AMP (Adenosin-5'-monophosphat, Dinatriumsalz), ADH (Alkoholdehydrogenase), RNS (Ribonucleinsäure): Boehringer GmbH, Mannheim.

Alle übrigen Substrate und Reagentien, p.A.:

Merck AG, Darmstadt.

Ergebnisse

I. Versuche zur Isolierung von Plasmamembranen nach Coleman (R. Coleman et al., 1967)

Aufgabe der folgenden Versuche war zunächst, eine möglichst einheitliche, von subzellulären Partikeln freie Plasmamembranfraktionen darzustellen. Dabei sollte einerseits die Methode nach Coleman angewandt und andererseits die Membranausbeute gesteigert werden.

Die Ergebnisse von drei verschiedenen Präparationen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der jeweils ersten gereinigten Membranfraktion (d: 1,13; d: 1,16; d: 1,13) der drei Präparationen.

In jedem Versuch wurden 40 g Rattenleber eingesetzt. Die gemessenen Leitenzyme geben Anreicherung, Ausbeute und Verunreinigung der Membranfraktion an. Ausbeute und Verunreinigung werden in Prozent angegeben, bezogen auf das Gesamthomogenat (Anreicherungsfaktor = relative spezifische Aktivität).

Zu Tabelle 1 und 2:

Die spezifische Aktivität der phosphatspaltenden Enzyme wird in μMol freigesetztes Phosphat/mg Protein/Stunde angegeben.

Succinatdehydrogenase: μMol Triphenylformazan/mg Protein/Stunde

NAD-spaltendes Enzym: μMol DPNH (NADH) /mg Protein/Stunde

Anreicherung: relative spezifische Aktivität = spezifische Aktivität der Fraktion : spezifische Aktivität des Gesamthomogenates

Ausbeute und Verunreinigung: angegeben in Prozent, bezogen auf das Gesamthomogenat

O - keine Aktivität

GH - Gesamthomogenat

F - Proteingehalt nach Folin, Angabe in mg/ml Membranfraktion

Tabelle 1

Gesamtdarstellung der drei Präparationen

[illegible]

Tabelle 2

Übersicht der jeweils ersten gereinigten Membranfraktion von drei Präparationen

Enzym	Spez. Aktivität			Anreicherung		
Präparation	1	2	3	1	2	3
Dichtegradient	1,13	1,16	1,13	1,13	1,16	1,13
5'-Nucleotidase	58,56	19,40	59,70	20,0	7,6	22,0
(Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	6,7	4,7	7,96	13,6		15,6
NADase	294,7	40,86	146,5	44,4	15,5	46,0
				Verunreinigung		
saure Phosphatase	5,5	1,12	0,46	0,08	0,04	0,01
Succinatdehydrog.	0	0,56	1,4	0	0,2	0,2
Glucose-6-Phosph.	0	5,34	0	0	0,08	0

Die dritte Präparation stellt eine Kombination der Ergebnisse der im methodischen Teil beschriebenen Vorversuche mit den nach Coleman beschriebenen Endschritten der Reinigung im diskontinuierlichen Dichtegradienten dar.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die Fraktion d: 1,13 einen hohen Reinheitsgrad, bezogen auf die Leitenzyme der jeweiligen subzellulären Partikel, aufweist. Außerdem konnte durch das Verfahren die höchste Anreicherung und Ausbeute an Plasmamembranen (d: 1,13) gewonnen werden.

Da im Saccharosegradienten der Dichte d: 1,16 erhebliche Mengen an Plasmamembranen enthalten sind, wurde trotz geringer Verunreinigung (weniger als 1%) diese Fraktion für die weiteren Versuche zur Präparation der Lyophilisate L₁ und L₂ mit den Membranen aus d: 1,13 vereinigt.

Eine Darstellung der Saccharosedichtegradienten vor und nach der Zentrifugation ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

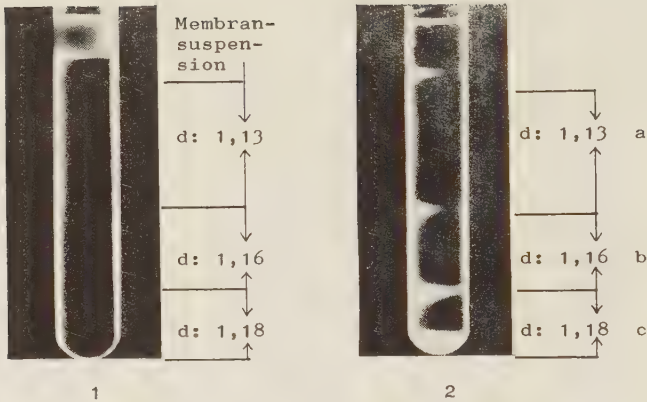


Abb. 2: Saccharosedichtegradienten

- 1 - Übersichtung mit vorgereinigter Membransuspension
- 2 - Anreicherung der Plasmamembranfraktionen an den Grenzflächen zwischen:
 - a) 0,25 m Saccharose und d: 1,13 (d: 1,13)
 - b) d: 1,13 und d: 1,16 (d: 1,16)
 - c) d: 1,16 und d: 1,18 (d: 1,18)

Die elektronenmikroskopische Kontrolle der Membranfraktion d: 1,13 und d: 1,16 zeigt Abbildung 3. Aus den Übersichtsaufnahmen ist zu entnehmen, daß die Präparationen überwiegend aus vesikulären Membranstücken verschiedener Größe bestehen.

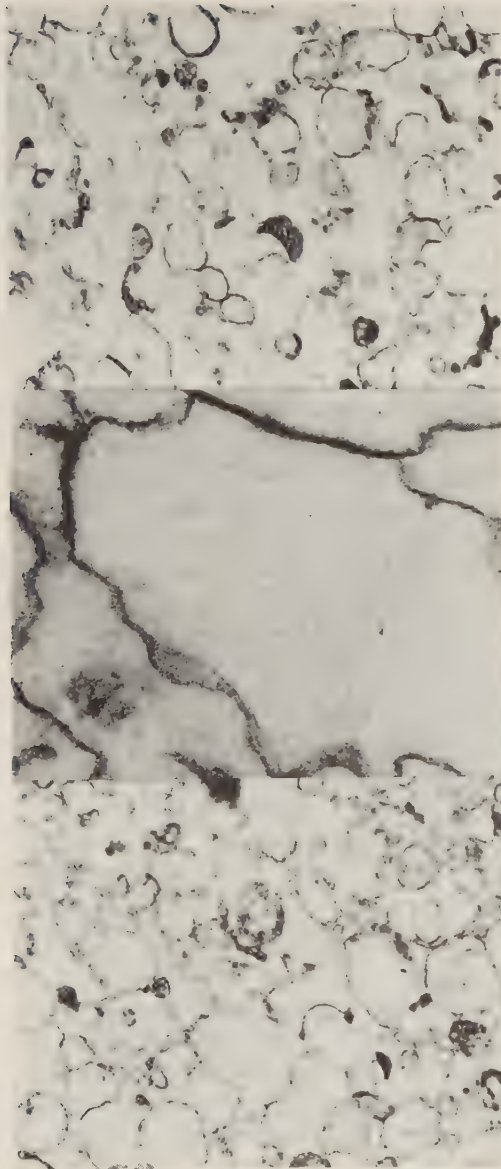
Zu Abbildung 3:

Elektronenmikroskopische Aufnahmen:

- 1 - Membranen des Gradienten 1,13; Endvergrößerung 28 000 fach
- 2 - Membranen aus d: 1,13; 80 000 fach vergrößert
- 3 - Membranen aus d: 1,16; 20 000fach vergrößert

0,5 ml einer Membransuspension werden mit 0,5 - 1,0 ml eines 0,15 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4 und bei 15 000 x g abzentrifugiert.

Weitere Angaben siehe Methoden.



1

2

3

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen

II. Einfluß von Phalloidin auf die ATPasen des aktiven Transportes der Plasmamembran *)

Aus Untersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber ging hervor, daß hohe Konzentrationen von Ouabain einen Verlust der Leberzelle an Kalium bewirken können (D. Hegner et al., 1969). Da Ouabain spezifisch die (Na^+-K^+) -ATPase hemmt, mußte die Frage geprüft werden, ob Phalloidin durch eine Hemmung der Transport-ATPasen die Freisetzung von Kalium bewirken kann.

Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß an frisch präparierten Membranen weder die Mg^{++} - noch die $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{Mg}^{++}$ -ATPase signifikant beeinflusst wird. Lediglich an vorgeschädigten Membranen (Dialyse gegen entionisiertes Wasser), deren spezifische Aktivitäten bereits um 28% (Mg^{++} -) und 37% (Na^+-K^+)-ATPase abgenommen haben, konnte erst durch hohe Phalloidindosen eine Hemmung nachgewiesen werden. Die Tabelle enthält zum Vergleich die Hemmwirkung von Ouabain auf die Mg^{++} -ATPasen und $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Mg}^{++}$ -ATPasen.

Emmelot identifiziert die alkalische bzw. neutrale K^+ -aktivierbare p-Nitrophenylphosphatase mit dem Kaliumzentrum der Transport-ATPasen. (P. Emmelot et al., 1969)

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß Phalloidin in den geprüften Konzentrationen weder die Mg^{++} -NPPase noch die $\text{K}^+-\text{Mg}^{++}$ -NPPase "frischer" Membranen in unseren Versuchen hemmt.

*) bereits veröffentlicht:

D. Hegner, F. Lutz, V. Eckermann, J. Gries und B. Schnorr: Effect of Phalloidin on Mg^{++} -ATPase, (Na^+-K^+) -ATPase and K^+ -dependent p-Nitrophenylphosphatase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochem. Pharmacology 18, 1 (1969)

Tabelle 3

Einfluß von Phalloidin auf die Membran-ATPasen

Membranen	Anzahl der gemess. Proben (n)	Enzym	Spez. Aktivität	$\mu\text{g Phall.}/\text{mg}$ Membranprot.	Hemmung Aktivier.	10^{-4}m Ouabain Hemmung
"frisch"	5	Mg^{++} -ATPase	$32,39 \pm 14,45$	20 200 400	- 1,5 + 5,3 - 2,2	- 2,8
		$(\text{Na}^+ - \text{K}^+) -$ ATPase	$4,76 \pm 2,92$	20 200 400	+ 2,0 + 20,2 - 14,8	- 54,5
		Mg^{++} -ATPase	$23,25 \pm 7,36$	20 200 400	- 2,7 - 11,6 - 4,9	- 8,1
"dialys."	4	$(\text{Na}^+ - \text{K}^+) -$ ATPase	$2,98 \pm 2,30$	20 200 400	+ 6,0 - 47,2 - 53,9	- 38,7

Die Hemmung von Ouabain auf die Mg^{++} - und die $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)\text{Mg}^{++}$ -ATPasen wurde an "frischen" und "dialysierten" Leberzellmembranen, präpariert nach der Methode nach Neville, gemessen (siehe auch Fußnote S. 24).

Von der $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{++}$ -Aktivität ist die Mg^{++} -aktivierte Grundaktivität abgezogen.

- Durchschnitt der prozentualen Hemmung
+ Durchschnitt der prozentualen Aktivierung

Tabelle 4
Einfluß von Phalloidin auf die K⁺-aktivierbaren p-Nitrophenylphosphatasen

n	Enzym	spez. Aktivität	µg Phalloidin/mg Membranprotein	Aktivität unter Phalloidineinwirkung
5	alkalische Mg ⁺⁺ -NPPase	3,11 ± 0,61	45 235	3,03 ± 0,64
	alkalische K ⁺ -Mg ⁺⁺ -NPPase	3,32 ± 1,36	45 235	2,75 ± 1,31
2	neutrale Mg ⁺⁺ -NPPase	9,16	45 175	8,53
	neutrale K ⁺ -Mg ⁺⁺ -NPPase	1,16	45 175	1,23

III. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Plasmamembranen (d: 1,13) wurden in vitro mit Phalloidin inkubiert. Die von Emmelot beschriebenen Mosaikstrukturen des Oberflächenreliefs können mit der "negativ-staining"-Methode dargestellt werden (P. Emmelot et al., 1967).

In unseren Versuchen konnten nach Einwirkung von Phalloidin keine reproduzierbaren morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Veränderungen der Oberflächenstruktur ist im wesentlichen von einer reproduzierbaren Fokussierung abhängig. Aus technischen Gründen wurden diese Versuche nicht weitergeführt.

IV. Analytische Daten und Eigenschaften lipidfreier Plasmamembransubstanzen

Die durch Dialyse von Plasmamembranen abtrennbaren wasserlöslichen Substanzen wurden lyophilisiert und als L_1 und L_2 bezeichnet (präparative Angaben siehe Methoden).

Das lyophilisierte Material besteht aus einem weißen, flockigen Pulver. Es ist in Aqua dest. und den meisten Puffern (Tris-, HCl-, Phosphat-, Citrat- und Acetat-Puffer) im neutralen Bereich bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml gut löslich. Bei Zimmertemperatur und längerem Stehen fließt das Pulver zu einer bernsteinfarbenen, pastösen Masse zusammen. Die Präparate wurden daher im Exsiccator über Phosphorpentoxid bei $0 - 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und erst unmittelbar vor Versuchsbeginn entnommen.

In Tabelle 5 sind einige chemisch-analytische Daten zusammengefaßt. Aus dieser Tabelle geht hervor, daß die Lyophilisate noch zu einem überwiegenden Teil aus nicht abdiälysiertem Saccharose bestehen. Versuche, die Saccharose abzudialysieren, führten zu einem in Aqua dest. völlig unlöslichen Präparat.

Tabelle 5

Analytische Daten von L_1 und L_2

Lyophilisat	L_1	L_2
Proteingehalt	5,63 $\mu\text{g}/\text{mg}$	18,75 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Disaccharide	880,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$	720,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Aminosäuren (bezogen auf 1-Leucin)	8,72 $\mu\text{g}/\text{mg}$	29,23 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Neuraminsäure	0,41 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1,15 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Ribonucleinsäure	0,18 $\mu\text{g}/\text{mg}$	1,34 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Desoxyribonucleinsäure	0,39 $\mu\text{g}/\text{mg}$	2,37 $\mu\text{g}/\text{mg}$

Elektrophorese von L_2 :

Das Ergebnis der Disk-Elektrophorese stellt Abbildung 4 dar. Abbildung 5 zeigt die Auswertung der Banden im "Beckmann-Analytrol".



Abb. 4: Disk-Elektrophorese von Lyophilisat L_2



Abb. 5: Photometrische Auswertung der Disk-Elektrophorese

Ordinate: Extinktionsdifferenz, abhängig von der Intensität der mit Amidoschwarz gefärbten Banden, bei 500 nm gemessen.

Abszisse: Abstandsverhältnis der Banden

V. Versuche zur Bindung von Phalloidin an Plasmamembranbestandteile

Aus früheren Untersuchungen ging hervor, daß ^3H -Desmethylphalloin zu Plasmamembranen der Leberzelle eine hohe Affinität besitzt (M. Frimmer et al., 1969). In den folgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob Phalloidin an die Lipid- oder Proteinkomponente gebunden wird.

A. Versuche zum Nachweis einer Bindung von Phalloidin an den Plasmamembranlipidextrakt

1. Versuchsanordnung mit Lipidextrakt und Phalloidin:

Der Lipidextrakt wurde in Chloroform-Methanol-Gemisch (2:1) gelöst und mit Phalloidin versetzt. Die Ansätze (Tabelle 6) wurden zwei Minuten im Rüttler (Mikrolitersystem "Eppendorf") geschüttelt und anschließend zwei Minuten bei 15000 x g ("Mikrofuge Eppendorf") abzentrifugiert. 0,1 ml Über-

Tabelle 6

Versuchsansatz

Ansatz Nr.	Lipidextrakt lösung	μg Phalloidin/ 0,2 ml Aq.dest.
1	0,2 ml	5,8
2	0,2 ml	29,0
3	0,2 ml	58,0

stand verdünnten wir mit 1,9 ml Aqua dest. In einer Quarzküvette, Schichtdicke D: 10 mm, wurde bei 295 nm (Absorptionsmaximum von Phalloidin) gegen Aqua dest. im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Im Kontrollansatz wurde der Lipidextrakt durch 0,2 ml Chloroform-Methanol-Gemisch ersetzt.

Aus Abbildung 6 geht hervor, daß unter der gewählten Versuchsanordnung das Verteilungsgleichgewicht von Phalloidin zur Lipid-bzw. wässrigen Phase trotz

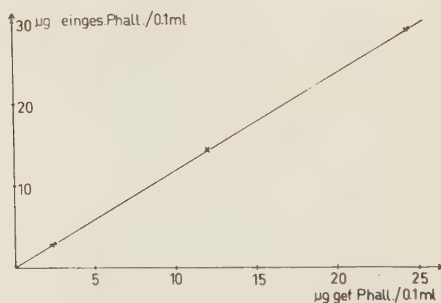


Abb. 6: Versuch zur Änderung des Verteilungsgleichgewichtes zwischen Plasmamembranlipidextrakt unter steigenden Phalloidinkonzentrationen

Lipidextraktlösung mit steigenden Phalloidinnmengen, bei 295 nm gemessen

steigender Konzentrationen eingesetzten Phalloidins nicht verändert wird.

2. Im folgenden Versuch wurde geprüft, ob Phalloidin ähnlich den Polyenantibiotika (V.T. Ivanov et al., 1969; M. Pinkerton et al., 1969), durch Bildung eines Komplexes mit monovalenten Ionen (K^+) stärkere lipophile Eigenschaften erhält.

Als Lipidphase diente ein Gemisch von 30% n-Butanol und 70% Toluol. Eine Phalloidinstammlösung (wässrige Phase) enthielt 322,2 μg in 2,5 ml Aqua dest. (51,52 μg / 0,4 ml).

Tabelle 7

Versuchsanordnung (1,5 ml/ Ansatz) in Anlehnung an Pressman (B.C. Pressman, 1968)

Ansatz	KCl-Lösung	Butanol-Toluol-Gem.	Phall. Lösung	Aqua dest.
1	-	1 ml	-	0,5 ml
2	-	1 ml	0,4 ml	0,1 ml
3	0,1 ml $5 \times 10^{-3} M$	1 ml	0,4 ml	-
4	0,1 ml $10^{-2} M$	1 ml	0,4 ml	-
5	0,1 ml $2 \times 10^{-2} M$	1 ml	0,4 ml	-
6	0,1 ml $4 \times 10^{-2} M$	1 ml	0,4 ml	-

Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37° C im Wasserbad intensiv geschüttelt, anschließend abzentrifugiert (2 Minuten bei 15 000 x g) und die organische Phase abpipettiert.

0,4 ml der wässrigen Phase wurden mit 1,6 ml Aqua dest. verdünnt und in einer Quarzküvette (D: 10 mm) bei 295 nm gegen Ansatz Nr. 1 wie im ersten Versuch gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 eingetragen. Daraus geht hervor, daß Phalloidin trotz steigender Kaliumkonzentrationen keine Verteilungsunterschiede zwischen Lipid- und wässriger Phase zeigt,

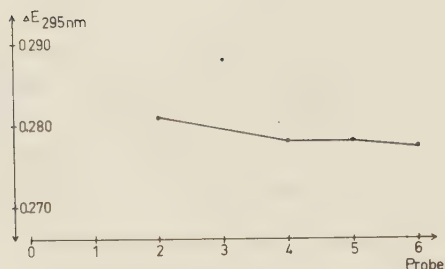


Abb. 7: Verteilungsunterschiede zwischen Plasmamembranlipidextrakt und Phalloidinlösung bei steigender Kaliumkonzentration

Die Extinktion bei 295 nm gibt die gefundene Phalloidinmenge der einzelnen Proben an, gegen die erste wird gemessen.

da bei Abwesenheit und in Gegenwart von Kalium jeweils die gleiche Menge Phalloidin in der wässrigen Phase gefunden wurde.

3. Versuche zur Änderung von Schubdiagrammen monomolekularer Membranlipidfilme unter Phalloidineinwirkung:

Um die Änderung der Oberflächenbesetzung von monomolekularen Lipidextraktfilmen durch Phalloidin zu prüfen, wurden Schubdiagramme nach der Methode nach Frommherz aufgenommen (H. Frommherz, 1969).

3.1. Stearinsäuremethylesterfilm und Phalloidin:

Als Lipidfilm diente zunächst Stearinsäuremethylester (in Chloroform 10^{-3} M gelöst. Mit einem Tropfen dieser Lösung wurde in einer Kammer der Apparatur nach Frommherz (H. Frommherz, 1969) auf Aqua dest. p_H 5,5 ein monomolekularer Film hergestellt. Eine zweite Kammer enthielt 0,1 mg Phalloidin in Aqua dest. p_H 5,5 gelöst. Über diese Phalloidinlösung wurde der Stearinsäuremethylesterfilm gescho-

ben und ein Schub von $5 \text{ dyn}/\text{-cm}^2$ vorgegeben.

3.2. Bei einem anderen Versuch wurde statt Stearinsäuremethylester eine Lösung von Plasmamembranlipidextrakt (15 mg Lipidextrakt im 10 ml Chloroform) benutzt und mit einem Tropfen dieser Lösung auf Aqua dest. p_H 5,5 ein monomolekularer Lipidfilm hergestellt. Der Lipidfilm wurde wiederum über die zweite Kammer mit 0,1 mg Phalloidinlösung geschoben. Nach Vorgabe von $5 \text{ dyn}/\text{-cm}^2$ konnte dann die Schubkraftänderung gemessen werden.

Der Versuch mit dem Membranlipidfilm wurde wiederholt. In der zweiten Kammer wurden dazu insgesamt 0,2 mg Phalloidin gelöst.

3.3. Als Kontrolle diente ein Versuch mit Plasmamembranlipidfilm, Methaemoglobin und Phalloidin. Es wurde wieder ein monomolekularer Plasmamembranlipidfilm hergestellt. Außer 0,2 mg Phalloidin lösten wir noch 0,15 mg Methaemoglobin und schoben den Lipidfilm darüber. Ein Schub von $5 \text{ dyn}/\text{-cm}^2$ wurde wieder vorgegeben, um eine Schubkraftänderung zu messen.

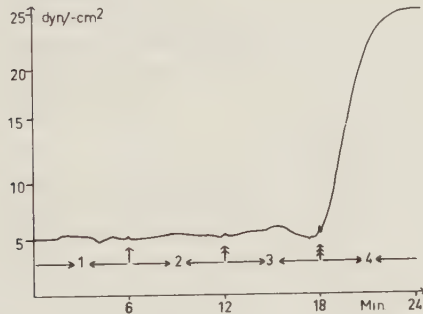


Abb. 8: Darstellung der Schubdiagramme von Lipidfilmen und Phalloidin

- 1 - Stearinsäuremethylesterfilm über 0,1 mg Phalloidin
- 2 - Membranlipidfilm über 0,1 mg Phalloidin
- 3 - Membranlipidfilm über 0,2 mg Phalloidin
- 4 - Membranlipidfilm über 0,2 mg Phalloidin und 0,15 mg Methaemoglobin (Kontrolle)

Aus den Ergebnissen in Abbildung 8 ist zu ersehen, daß Phalloidin die Oberflächenbesetzung eines monomolekularen Lipidfilmes, hergestellt aus Stearinsäuremethylester und Lipidextrakt isolierter Plasmamembranen, nicht ändert. Methaemoglobin war als Kontrollsubstanz wirksam, gemessen an der Schubkraftänderung ($25 \text{ dyn}/\text{cm}^2$); Phalloidin allein zeigte keinen Effekt.

Aus unseren Versuchen mit Lipiden und Phalloidin geht hervor, daß das Gift keine Affinität zu Plasmamembranlipiden besitzt.

B. Versuche mit nichtlipidhaltigen Plasmamembranbestandteilen und Phalloidin

Die vorangegangenen Versuche haben keinen Hinweis ergeben, daß die hohe Affinität des Phalloidins zur Plasmamembran der Leberzelle aus einer Bindung mit lipidhaltigen Komponenten resultieren kann.

In den folgenden Versuchen wurde daher geprüft, ob die durch Dialyse abtrennbaren, nichtlipidhaltigen Membransubstanzen mit Phalloidin in Wechselwirkung treten.

1. Die durch das erste Dialyseverfahren aus frischen Plasmamembranen (d: 1,13 und d: 1,16) abtrennbaren, wasserlöslichen Gemische wurden zunächst im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II und in Quarzküvetten (d: 10mm) von 200 bis 340 nm gegen Aqua dest. gemessen.

Abbildung 9 zeigt das Spektrum der 5fach verdünnten wasserlöslichen Membransubstanzen, die bei 269,4 nm ein Maximum besitzen.

Im nächsten Versuch wurde dann geprüft, ob Phalloidin mit den Membransubstanzen ein neues Spektrum ergibt:

3 ml der wasserlöslichen Substanz wurden mit 0,05 ml Phalloidinlösung versetzt (echtes Gemisch) und unter ständigem Durchmischen (mechanische Rüttelmaschine) 20 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und wie oben von 220 bis 320 nm gemessen, im

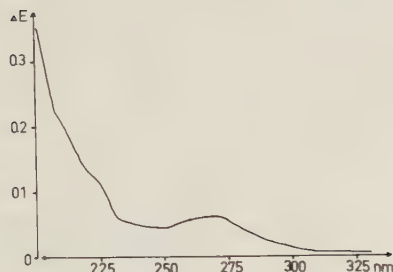


Abb. 9: Spektrum eines Gemisches aus Plasmamembran-
substanzen, gewonnen nach dem ersten Dialy-
severfahren

Abstand von 0,5 nm.

Zur Kontrolle wurden 1,5 ml der Substanzlösung und 1,55 ml Aqua dest. mit 0,05 ml Phalloidinlösung getrennt in Quarzküvetten (D: 5 mm) hintereinander in einem Strahlengang (optisches Gemisch) gegen Aqua dest. wie oben gemessen.

3 ml des wasserlöslichen Substanzgemisches wurden ebenfalls von 220 bis 320 nm wie unter 1. registriert. Abbildung 10 gibt eine Übersicht der Spektren dieser Vorversuche.

Aus Abbildung 10, 1 geht hervor, daß Phalloidin mit den Membransubstanzen ein Spektrum ergibt, das sich von 2 und 3 durch seine Maxima unterscheidet. Aus Abbildung 10, 3 ist zu ersehen, daß das Spektrum des Substanzgemisches von dem typischen Phalloidinspektrum getrennt darstellbar ist.

Aus diesen Vorversuchen war zu entnehmen, daß die abdialysierten Membranbestandteile mit Phalloidin reagieren können.

Die Absorptionsspektren der nachfolgenden Versuche wurden im Cary-Recording-Spectrophotometer Nr. 14 gemessen.

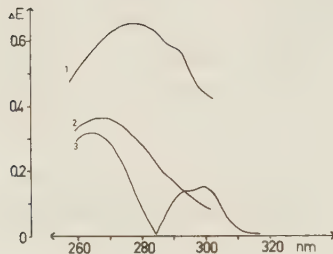


Abb. 10: Nachweis einer Reaktion von Phalloidin mit Plasmamembransubstanzen

- 1 - 3,0 ml unverdünnter Überstand der ersten Dialyse mit 0,05 ml Phalloidinlösung (echtes Gemisch), Extinktionsmaximum bei 276,5 nm und Schulter bei 291 nm
- 2 - 3,0 ml unverdünnter Überstand, Extinktionsmaximum bei 268 nm
- 3 - 1,5 ml Überstand und 0,05 ml Phalloidinlösung (Extinktionswerte verdoppelt) hintereinander (optisches Gemisch), Extinktionsmaxima bei 264 nm und 298 nm, Schultern bei 292 nm und 301,5 nm

2. Phalloidinspektren:

Zur Orientierung über die einzusetzenden Phalloidinmengen wurde das Spektrum von 100 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. fortlaufend von 270 bis 320 nm registriert; Abbildung 11.

C. Differenzspektren der Lyophilisate L_1 und L_2 mit Phalloidin

Zur Darstellung von Differenzspektren wurde wie folgt verfahren:

Vor jedem Versuch wurde zunächst ein Spektrum des Substanzgemisches (L_1 oder L_2) gemessen.

Anschließend wurden die Versuche in folgender Anordnung registriert:

Hauptstrahlengang	Vergleichsstrahlengang
-------------------	------------------------

A	A
---	---

B	B
---	---

Empfänger	Empfänger
-----------	-----------

A - lyophilisiertes Substanzgemisch

B - Phalloidinlösung

Die Registrierungen dieser Versuchsanordnung werden als "Nulllinie" bezeichnet. Die Strahlengänge enthalten optische Gemische, die in Quarzküvetten (D: 10 mm) von 240 bis 350 nm gemessen werden. Für die als "Differenzspektrum" bezeichneten Registrierungen wurden die Lösungen A und B des Vergleichsstrahles gemischt und anschließend wieder einpipettiert. Der Vergleichsstrahlengang enthält jetzt ein echtes Gemisch, das gegen das optische des Hauptstrahlenganges gemessen wird.

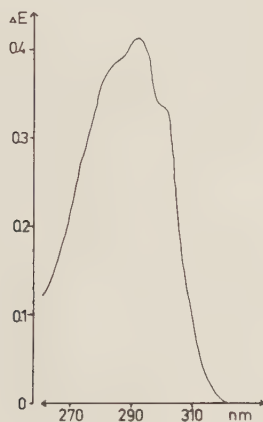


Abb. 11: Spektrum von 100 µg Phalloidin

1. Lyophilisat L₁, Phalloidin und Harnstoff

Da die ab dialysierbaren Membranbestandteile in Wechselwirkung mit Phalloidin treten, wurde dieser Befund an dem Lyophilisat L₁ überprüft.

1.1. Zunächst wurde das Spektrum von 2,5 mg und 12,5 mg L₁ in 2,5 ml Aqua dest. registriert, Abbildung 12.

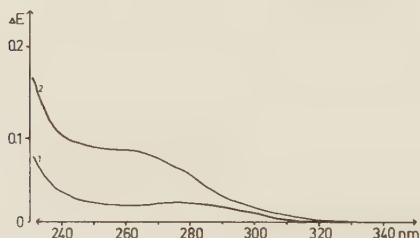


Abb. 12: Spektren von Substanz L₁

- 1 - 1 mg L₁ in 1,0 ml Aqua dest.
- 2 - 5 mg L₁ in 1,0 ml Aqua dest.

Messung eines Differenzspektrums:

Die vordere Küvette des Hauptstrahlenganges enthielt 12,5 mg L₁ in 2,5 ml Aqua dest., die hintere 100 µg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. Die vordere und hintere Küvette des Vergleichsstrahlenganges enthielten je 6,25 mg L₁ und 50 µg Phalloidin (echtes Gemisch). Das Differenzspektrum wurde bei 22° C 10 Minuten und 240 Minuten nach der ersten Messung nochmals aufgenommen, um eine Zeitabhängigkeit zu prüfen.

Das Differenzspektrum dieses Versuchs zeigt Abbildung 13. Daraus geht hervor, daß es unter unseren Versuchsbedingungen zu einer zeitabhängigen Bildung des Differenzspektrums von Phalloidin mit nichtlipidhaltigen Membranbestandteilen kommt.

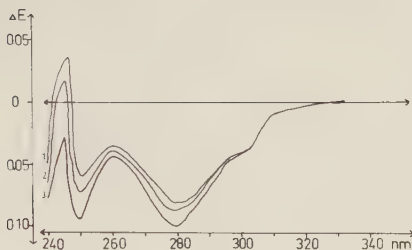


Abb. 13: Änderung des Differenzspektrums zwischen L₁ und Phalloidin in zeitlicher Abhängigkeit ¹

- 1 - Differenzspektrum von 12,5 mg L₁ und 100 µg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest.
- 2 - Differenzspektrum nach 10 Minuten
- 3 - Differenzspektrum nach 240 Minuten

Extinktionsmaxima bei 249,5 nm und 279 nm,
Extinktionsminima bei 259,5 nm und 245 bzw.
246,5 nm, Schulter bei 302,5 nm

Im folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob die Entstehung des Differenzspektrums durch verschiedene Verbindungen beeinflusst werden kann.

Es ist bekannt, daß Harnstoff Wasserstoffbrückenbindungen trennen kann (H. Netter, 1959). Zur Reduktion von Mercaptidbindungen wird im allgemeinen 6 bis 8 m Harnstoff benutzt (B. Liebold u. G. Braunitzer, 1959).

Um den Einfluß von Harnstoff auf das gefundene Differenzspektrum zu prüfen, wurde 240 Minuten nach der ersten Registrierung in alle vier Küvetten Harnstoff in einer Endkonzentration von 0,66 m gegeben; Abbildung 14,2. Nach weiteren 40 Minuten wurde die Harnstoffkonzentration in allen Küvetten auf 1,98 m erhöht und erneut gemessen; Abbildung 14,3.

Das Ergebnis der Harnstoffzugabe ist aus Abbildung 14 zu ersehen. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß sich das Differenzspektrum (Maxima) in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration der Null-

linie nähert. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Wasserstoffbrücken, möglicherweise auch Merkaptidbindungen, für das entstandene Differenzspektrum von Bedeutung sein könnten.

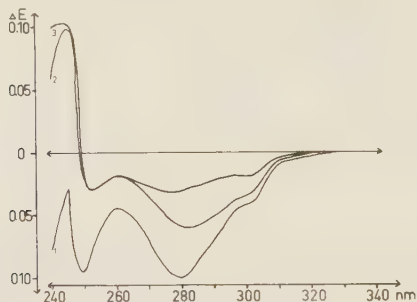


Abb. 14: Änderung des Differenzspektrums nach Harnstoffeinwirkung

- 1 - Differenzspektrum von 12,5 mg L_1 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Aqua¹ dest. nach 240 Minuten
- 2 - Differenzspektrum nach der ersten Harnstoffzugabe (100 mg = 0,66 m)
- 3 - Differenzspektrum nach zweiter Harnstoffzugabe (200 mg), insgesamt 300 mg = 1,98 m

1.2. Der Versuch unter 1.1. wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt, mit dem Unterschied, daß jeweils die doppelte Menge an L_1 , Phalloidin und Harnstoff pro 2,5 ml Ansatz eingesetzt wurden, Abbildung 15 und 16.

Nach dem vorangegangenen Versuch lag es nahe zu prüfen, ob "SH-Reagenzien" die Entstehung eines Differenzspektrums verhindern können. Als SH-Reagenz wurde p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) gewählt, das durch Substitution eine stabile, kovalente Bindung eingehen kann (K. Wallenfels, 1964). Gleichzeitig bietet p-CMB die Möglichkeit, die Bildung der Merkaptidbindung durch Zunahme der

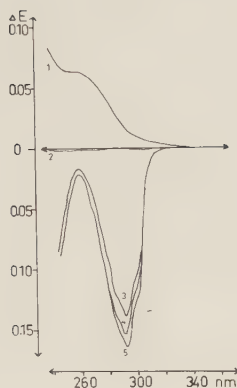


Abb. 15: Änderung des Differenzspektrums zwischen Phalloidin und L_1 in zeitlicher Abhängigkeit (siehe auch Abb. 13)

- 1 - Spektrum von 25 mg L_1 in 2,5 ml Aqua dest.
- 2 - Nulllinie mit 25 mg L_1 und 200 μ g Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest.
- 3 - Differenzspektrum (1. Messung)
- 4 - Differenzspektrum nach 10 Minuten
- 5 - Differenzspektrum nach 240 Minuten

Extinktionsmaxima bei 290,6 nm und 258 nm

Lichtabsorption bei 253,7 nm zu verfolgen (J.D. Boyer, 1954).

2. Versuche, die Bildung eines Differenzspektrums von Lyophilisat L_1 und Phalloidin durch p-CMB zu beeinflussen

2.1. Zunächst wurde geprüft, ob nach Einwirkung von p-CMB auf L_1 eine Extinktionszunahme bei 253,7 nm nachweisbar ist.

Der Versuchsansatz nach Wallenfels enthielt 12,5 mg L_1 und 5×10^{-5} m p-CMB in 2,5 ml 0,05 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4 (K. Wallenfels et al., 1964).

p-CMB wurde nach einer Vorschrift von Boyer gelöst (J.D. Boyer, 1954).

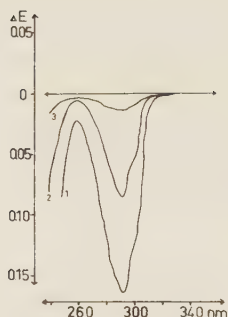


Abb. 16: Änderung des Differenzspektrums nach Harnstoffeinwirkung (s. auch Abb. 14)

- 1 - Differenzspektrum mit 25 mg L_1 und 200 μ g Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. nach 240 Minuten
- 2 - Differenzspektrum nach erster Harnstoffzugabe (200 mg)
- 3 - Differenzspektrum nach zweiter Harnstoffzugabe (400 mg)

Das Spektrum wurde bei 28° C innerhalb zwei Stunden im Abstand von zwölf Minuten zehnmal gemessen. Nach 90 Minuten stieg die Extinktion bei 253,7 nm auf ein Maximum an (Extinktionsanstieg: 0,015); Abbildung 17. Der Extinktionsanstieg ist mit den Angaben von Wallenfels vergleichbar (K. Wallenfels et al., 1964).

Im folgenden Versuch sollte geprüft werden, ob nach Einwirkung von p-CMB auf das Substanzgemisch L_1 das typische Differenzspektrum von Phalloidin und L_1 noch nachgewiesen werden kann.

2.2. Zunächst wurde eine Nulllinie in der beschriebenen Meßanordnung registriert.

Die vorderen Küvetten beider Strahlengänge ent-

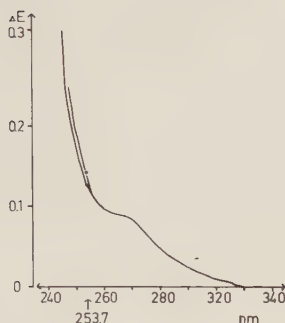


Abb. 17: Nachweis einer Reaktion von p-CMB mit L_1
Nach 90 Minuten (10 Messungen) steigt die
Extinktion auf ein Maximum an, um 0,015
bei 253,7 nm

hielten je 12,5 mg L_1 und 5×10^{-5} m p-CMB in 2,5 ml
0,05 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4; die hinteren 50 μ g
Phalloidin in 2,5 ml Tris-Puffer.

Messung des Differenzspektrums:

30 Minuten nach Einwirkung von p-CMB auf L_1 wurde
das Differenzspektrum bei 22°C registriert; Ab-
bildung 18, 2. Der Hauptstrahlengang enthielt das
optische Gemisch, die vordere und hintere Küvette
des Vergleichsstrahlenganges enthielten je 6,25 mg
 L_1 , $2,5 \times 10^{-5}$ m p-CMB und 25 μ g Phalloidin in
2,5 ml Tris-Puffer (echtes Gemisch). Das Differenz-
spektrum wurde 60 Minuten nach der ersten Messung
wieder registriert.

120 Minuten nach der ersten Registrierung wurde in
alle vier Küvetten EDTA (Äthylendiamintetraessig-
säure-di-Natriumsalz) in einer Endkonzentration
von 10^{-3} m gegeben und erneut gemessen; Abbildung 18,3.

Aus Abbildung 18 geht hervor, daß nach p-CMB-Einwirkung das typische Differenzspektrum nicht mehr registriert wird. EDTA hatte keinen Einfluß.

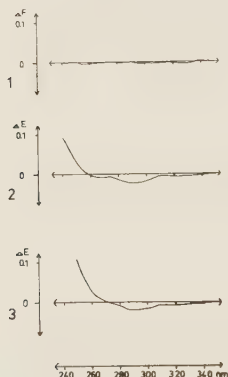


Abb. 18: Versuch zur Darstellung eines Differenzspektrums von Phalloidin und L_1 , das 30 Minuten mit p-CMB vorinkubiert wurde

- 1 - Nulllinie mit 5 mg L_1 , 5×10^{-5} m p-CMB und 50 μ g Phalloidin in 0,05 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4
- 2 - Differenzspektrum
- 3 - Differenzspektrum nach 10^{-3} m EDTA-Zugabe (in alle vier Küvetten)

In den folgenden Versuchen benutzten wir das Lyophilisat L_2 .

3. Lyophilisat L_2 und Phalloidin

In diesem Versuch überprüften wir den Befund des ersten Vorversuches (B.1.), gemessen im Zeiss-Spektralphotometer PMQ II.

Dieser Versuch wurde mit L_2 in gleicher Anordnung und definierten Substanzkonzentrationen durchgeführt. Gemessen wurden in Quarzküvetten die Spek-

tren von 1,5 mg L_2 und anschließend von 12,5 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. gegen Aqua dest. (eine Küvette pro Strahlengang).

1,5 mg L_2 und 12,5 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. wurden 20 Minuten bei 37°C inkubiert und wieder gegen Aqua dest. gemessen (echtes Gemisch).

1,5 mg L_2 und 12,5 μg Phalloidin in 1,25 ml Aqua dest. wurden hintereinander in je einer Quarzküvette (D: 5 mm) gegen Aqua dest. gemessen.

Die Übersicht der Spektren ist in Abbildung 19 eingetragen.

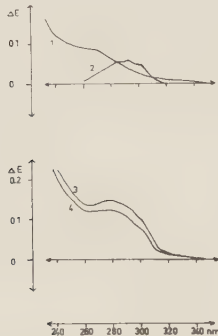


Abb. 19: Nachweis einer Reaktion von Phalloidin mit L_2 (s. auch Abb. 10)

- 1 - 1,5 mg L_2 in 2,5 ml Aqua dest.
- 2 - 12,5 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest.
- 3 - 1,5 mg L_2 und 12,5 μg Phalloidin hintereinander² (optisches Gemisch)
- 4 - 1,5 mg L_2 und 12,5 μg Phalloidin gemischt (echtes Gemisch)

Extinktionsanstieg bei 280 nm um 0,022

Das inkubierte Gemisch (Abbildung 19, 3) zeigt gegenüber dem optischen Gemisch (Abbildung 19, 4) bei

280 nm einen Extinktionsanstieg von 0,022. Daraus geht hervor, daß der Befund des ersten Vorversuches auch mit L_2 reproduzierbar ist.

4. Konzentrationsabhängigkeit der Differenzspektren von Lyophilisat L_2 und Phalloidin

Das Spektrum von 1 mg, 1,5 mg und 2 mg L_2 in 2,5 ml Aqua dest. wurde gegen Aqua dest. gemessen. Zu jeder L_2 -Konzentration wurde mit 50 μ g und 100 μ g Phalloidin eine Nulllinie und ein Differenzspektrum registriert.

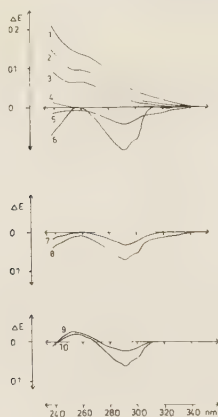


Abb. 20: Abhängigkeit der Differenzspektren von verschiedenen L_2 - und Phalloidinkonzentrationen

- 1 - Spektrum von 2 mg L_2 in 2,5 ml
- 2 - Spektrum von 1,5 mg L_2 in 2,5 ml
- 3 - Spektrum von 1 mg L_2 in 2,5 ml
- 4 - Nulllinie zu den Differenzspektren

Differenzspektren mit

- 5 - 1 mg L_2 und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml
- 6 - 1 mg L_2 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml
- 7 - 1,5 mg L_2 und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml
- 8 - 1,5 mg L_2 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml
- 9 - 2 mg L_2 und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml
- 10 - 2 mg L_2 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml

In Abbildung 20, 1 - 10, sind die Spektren des Versuchs in einer Übersicht eingetragen. Der Versuch zeigt, daß pro Mol Phalloidin 295,82 mg Protein des Lyophilisates L_2 benötigt werden, um das typische Differenzspektrum zu erhalten (Molekulargewicht von Phalloidin: 788,85).

In den folgenden Versuchen benutzten wir ein neues Lyophilisat L_3 , hergestellt aus Rattenleberzellmembranen (d: 1,13 und d: 1,16) nach dem ersten Dialyseverfahren. L_3 hat einen Proteingehalt von 5,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Substanz (5,2%).

Die abdialysierten Membranbestandteile enthalten Neuraminsäure (s. chemisch-analytische Daten S. 28), die ein Bestandteil der Oberfläche der äußeren Zellmembranen ist (W. Gielen et al., 1968; E.L. Benedetti u. P. Emmelot, 1967).

Es ist bekannt, daß neuraminsäurehaltige Strukturen der Plasmamembranen als Rezeptoren ("Binding-sites") für einige Pharmaka, Gifte und Blutgruppensubstanzen dienen (G. Uhlenbruck, 1967).

Zum Studium für die Bedeutung der Neuraminsäure an der Zelloberfläche wurde die N-acetylneuraminatglycohydrolase (E.C. 3.2.1.18) verwendet (P.M. Kraemer, 1968).

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die N-acetylneuraminidase aus *Vibrio comma* (cholerae), die die N-acetylneuraminsäure in der Ketogruppe abspaltet (A. Gottschalk, 1960), die nachfolgende Bildung eines Differenzspektrums beeinflusst.

5. Lyophilisat L_3 , Neuraminidase und Phalloidin

Wir verwendeten einen 0,05 m Natriumacetat-Essigsäure-Puffer p_H 5,5 mit einem Zusatz von 0,9 g Natriumchlorid und 0,1 g Calciumchlorid pro 100 ml Puffer. In diesem Puffer ist auch die Neuraminidase (500 I.E./ml) gelöst.

5.1. Das Spektrum von 25 mg L_3 in 2,5 ml Puffer

wurde gegen Puffer gemessen, Abbildung 21, 1.

Darstellung der Nulllinie:

Der Hauptstrahlengang enthielt das optische Gemisch, der Vergleichsstrahlengang in vorderer und hinterer Küvette je 12,5 mg L_3 und 50 μ g Phalloidin; Abbildung 21, 2.

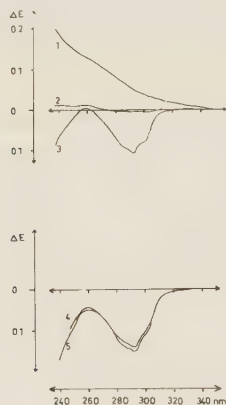


Abb. 21: Versuche zum Nachweis einer Änderung des Differenzspektrums von Phalloidin und L_3 nach Neuraminidaseeinwirkung

- 1 - Spektrum von 25 mg L_3 in 2,5 ml Natriumacetat-Essigsäure-Puffer
- 2 - Nulllinie von 25 mg L_3 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer
- 3 - erste Messung des Differenzspektrums
- 4 - Differenzspektrum nach erster Neuraminidasezugabe (30 Minuten nach erster Messung), 100 I.E. Neuraminidase/25 mg L_3
- 5 - Differenzspektrum nach zweiter Neuraminidasezugabe (60 Minuten nach erster Messung), 100 I.E./25 mg L_3 ; insgesamt jetzt 200 I.E. Neuraminidase/25 mg L_3

Differenzspektrum und Neuraminidase:

30 Minuten nach der ersten Messung des Differenzspektrums wurden 0,2 ml (100 I.E.) Neuraminidase pro 25 mg L_3 zum Ansatz hinzugegeben und bei 22° C

gemessen; Abbildung 21, 4.

30 Minuten nach der ersten Neuraminidasezugabe wurde wieder 100 I.E. einpipettiert und erneut gemessen; Abbildung 21, 5.

Aus der Abbildung 21 geht hervor, daß in unserem Versuch das Differenzspektrum durch die N-acetylneuraminidase nicht verändert wurde.

5.2. Der Versuch wurde wiederholt.

Darstellung der Nulllinie:

Die vorderen Küvetten enthielten jetzt 25 mg L_3 und 500 I.E. Neuraminidase in 2,5 ml Puffer, die hinteren je 100 μ g Phalloidin; Abbildung 22, 1.

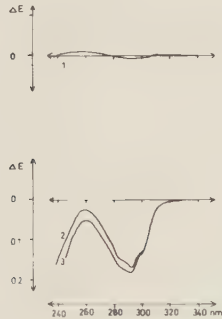


Abb. 22: Einwirkung von Neuraminidase auf das Differenzspektrum von L_3 und Phalloidin

- 1 - Nulllinie mit 25 mg L_3 , 500 I.E. Neuraminidase pro 25 mg L_3 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer
- 2 - Differenzspektrum
- 3 - Differenzspektrum nach 60 Minuten Inkubation

Registrierung des Differenzspektrums:

Der Hauptstrahlengang enthielt das optische Gemisch

(s. Nulllinie), der Vergleichsstrahlengang in beiden Küvetten je 12,5 mg L_3 , 250 I.E. Neuraminidase und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer; Abbildung 22, 2. Das Differenzspektrum wurde bei 22°C gemessen und anschließend wurden die Ansätze bei 37° C im Wasserbad inkubiert; Abbildung 22, 3.

Auch bei diesem Versuch bewirkte die N-acetylneuraminidase keine Veränderung des Differenzspektrums. Die Befunde lassen darauf schließen, daß die geprüfte N-acetylneuraminidase die Bindung von Phalloidin nicht beeinflußt.

Weiterhin war zu prüfen, ob die Bindung des Phalloidins, gemessen an dem Differenzspektrum, durch Proteasen beeinflußt wird. Als Vertreter einer polyvalenten Protease wurde Trypsin gewählt. Dabei sollte untersucht werden, ob eine trypsinempfindliche Polypeptidstruktur für die Bindung des Phalloidins an das Substanzgemisch L_3 notwendig ist.

6. Lyophilisat L_3 , Trypsin und Phalloidin

6.1. Die Reagenzien wurden in 0,2 ml Phosphatpuffer p_H 7,0 nach Fasold und Gundlach gelöst (H. Fasold u. G. Gundlach, 1962).

Darstellung der Nulllinie:

Die vorderen Küvetten enthielten 25 mg L_3 und 0,25 mg Trypsin in 2,5 ml Puffer, die hinteren je 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer; Abbildung 23, 1.

Darstellung des Differenzspektrums:

Der Hauptstrahlengang enthielt das optische Gemisch, der Vergleichsstrahlengang in vorderer und hinterer Küvette je 12,5 mg L_3 , 0,125 mg Trypsin und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer (echtes Gemisch); Abbildung 23, 2.

Das Differenzspektrum wurde nach der ersten Messung eine Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert und erneut gemessen; Abbildung 23, 3.

6.2. Lyophilisat L_3 , Trypsin und Phalloidin wurden in diesem Versuch in 0,05 m Tris-HCl-Puffer p_H 7,4 gelöst.

Registrierung der Nulllinie:

Die vorderen Küvetten enthielten 25 mg L_3 in 2,5 ml Puffer, die hinteren 100 μ g Phalloidin; Abbildung 23, 4.

Registrierung des Differenzspektrums:

Der Hauptstrahlengang enthielt das optische Gemisch (s. Nulllinie), der Vergleichsstrahlengang enthielt in beiden Küvetten je 12,5 mg L_3 und 50 μ g Phalloidin in 2,5 ml Puffer. Das Differenzspektrum wurde bei 28° C gemessen.

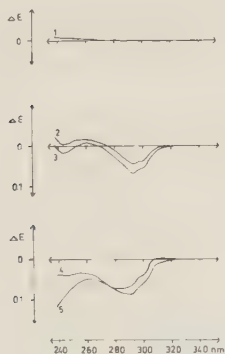


Abb. 23: Veränderung des Differenzspektrums von L_3 und Phalloidin unter Trypsineinwirkung

- 1 - Nulllinie mit 25 mg L_3 , 0,25 mg Trypsin/25 mg L_3 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Phosphatpuffer
- 2 - Differenzspektrum
- 3 - Differenzspektrum nach 30 Minuten Inkubation bei 37° C
- 4 - Nulllinie mit 25 mg L_3 und 100 μ g Phalloidin in 2,5 ml Tris-HCl-Puffer
- 5 - Differenzspektrum nach zweimaliger Gabe von je 0,1 mg Trypsin/25 mg L_3
- 6 - Differenzspektrum nach zwei Trypsin-gaben und Inkubation von 24 Stunden bei 37° C

30 Minuten nach der ersten Messung wurden 0,1 ml Trypsin (1 mg/ml) pro 25 mg L_3 zum Ansatz hinzugegeben. 30 Minuten nach der ersten Trypsingabe wurde die Trypsinmenge um das doppelte erhöht. Nach zwei Trypsinzugaben konnte keine Änderung des Differenzspektrums festgestellt werden; Abbildung 23,5. Nach der zweiten Trypsingabe wurde der Versuchsansatz 24 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend erneut gemessen; Abbildung 23, 6.

Wie aus der Abbildung 23, 5 - 6 hervorgeht, bleibt nach Einwirkung von Trypsin über 24 Stunden ein Differenzspektrum zwischen Phalloidin und L_3 erhalten. Es kommt jedoch zu einer Verschiebung zu der für das Differenzspektrum vor der Inkubation typischen Maxima.

7. Rinderserumalbumin und Phalloidin

Um zu prüfen, ob das Differenzspektrum zwischen Phalloidin und Membranbestandteilen spezifisch ist oder auch mit anderen Proteinen dargestellt werden kann, wurde als Beispiel eines Proteins Rinderserumalbumin (SA) gewählt.

Die vorderen Küvetten enthielten je 2,5 mg SA in 2,5 ml Aqua dest., die hinteren je 100 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest.

Differenzspektrum:

Der Hauptstrahlengang enthielt das optische Gemisch, die vordere und hintere Küvette des Vergleichsstrahlenganges enthielten je 1,25 mg SA und 50 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest. Das Differenzspektrum wurde bei 25°C gemessen und die Registrierungen in zeitlichem Abstand wiederholt.

In Abbildung 24 ist das Ergebnis dargestellt.

Die meßbaren Differenzspektren gleichen denen von L_2 und L_3 , sind jedoch von dem mit der Substanz L_1 unterschieden. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß die Absorptionsmaxima zwischen L_1 und

Phalloidin in zeitlicher Abhängigkeit zunehmen, während sie bei SA und Phalloidin abnehmen (näher sich der Nulllinie).

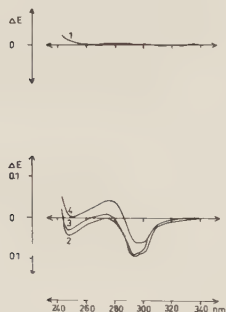


Abb. 24: Darstellung der Differenzspektren von Rinderserumalbumin und Phalloidin

- 1 - Nulllinie von 2,5 mg Albumin und 100 μg Phalloidin in 2,5 ml Aqua dest.
- 2 - Differenzspektrum nach erster und zweiter Messung (im Abstand von 30 Minuten)
- 3 - Differenzspektrum nach dritter Messung (60 Minuten nach erster Messung)
- 4 - Differenzspektrum nach vierter Messung (90 Minuten nach erster Messung)

Diskussion

Die Methode zur Isolierung von Leberzellmembranen nach Coleman konnte mit reproduzierbaren Ergebnissen angewandt werden. Dabei zeigte sich, daß diese Methode stark von individuellen und experimentellen Bedingungen abhängig ist. Für die Membranausbeute ist die Dichte der Homogenisatoren (radiale Weite 0,34 mm und 0,18 mm) entscheidend. Auch eignen sich die Lebern jüngerer Tiere besser als die älterer; die Ausbeute an Membranen nimmt mit dem Alter der Tiere ab.

Wenn die Homogenisatoren die von Coleman angegebenen Maße nicht besitzen, müssen die Ergebnisse der Methoden anhand der Leitenzyme überprüft werden. Unsere Vorversuche und Präparationen zeigen dazu, daß die Anreicherungen, wie Coleman sie angibt, erreicht werden können, daß aber Ausbeute und Reinheit der Membranfraktionen nicht wesentlich zu steigern sind. Die elektronenmikroskopischen Kontrollen zeigen, daß es sich bei den Plasmamembranen vorwiegend um vesikuläre Strukturen handelt.

Da hohe Dosen Ouabain einen Kaliumverlust der Leberzelle an der isoliert perfundierten Leber bewirken können, wurde die Wirkung von Phalloidin auf die ATPasen des aktiven Kationentransportes untersucht. Wir prüften die Mg^{++} - und die $(Na^{+}-K^{+})Mg^{++}$ -ATPase und die K^{+} -aktivierbare p-Nitrophenylphosphatase, da sie Emmelot mit dem Kaliumzentrum der Transport-ATPasen identifiziert (P. Emmelot et al., 1969).

Die Enzyme des aktiven Transportes können selbst durch hohe Dosen Phalloidin nicht gehemmt werden. Nach neueren Befunden ist eine Hemmwirkung auch nicht zu erwarten (M. Frimmer u. G. Weil, 1968). Tetraaethylammonium verhindert oder unterbricht den durch Phalloidin verursachten Kaliumverlust. Man muß daher annehmen, daß Phalloidin den Kaliumkanal öffnet, wobei der feinere Mechanismus bisher noch unbekannt ist.

Eine Parallele dazu kennt man aus der Toxikologie.

Das Leucocidin, ein Staphylokokkenprodukt, erhöht an

der Leucocytenmembran der Kaliumefflux und bewirkt sekundär einen Austritt von lysosomalen Enzymen. Tetraäthylammonium hemmt auch die Leucocidinwirkung. Es wurde vermutet, daß das Leucocidin die Konformation des Triphosphoinosits in der Oberfläche der Leucocytenmembran ändert (A.M. Woodin et al., 1968). Weiterhin wurde auch die Wirkungsweise der Polyenantibiotika diskutiert, die die Kaliumpermeabilität von Membranen erhöhen (J.N. Fain, 1964). Dieser Effekt ist mit der Fähigkeit verbunden, Kationenkomplexe zu bilden, die erhöhte lipophile Eigenschaften besitzen (K.-H. Wipf et al., 1969; M. Pinkerton et al., 1969). Die Untersuchungen von Ivanov zeigen, daß es sich bei dem Kaliumkomplex der Polyenantibiotika um eine starre, symmetrische Konformation handelt (V.T. Ivanov et al., 1969). Bei Phalloidin konnte keine Kaliumkomplexbildung mit erhöhter lipophiler Wirkung nachgewiesen werden. Offensichtlich paßt das Kalium räumlich nicht mehr in die ausgefüllte Ringstruktur des Phalloidins hinein. Die Wirkungsweise des Phalloidins kann wahrscheinlich nicht mit der der Polyenantibiotika verglichen werden.

Alle Versuche, eine Bindung des Phalloidins an Plasmamembranlipide nachzuweisen sind negativ verlaufen. Zusammenfassend ist festzustellen, daß Phalloidin die Transport-ATPasen nicht hemmt und nicht an Membranlipide gebunden wird.

Es besteht deshalb die Wahrscheinlichkeit, daß die Bindung von Phalloidin an nichtlipidhaltige Membranbestandteile erfolgt. Um diese Vermutung zu prüfen, wurden Versuche unternommen, solche Bestandteile abzudialysieren. Dabei ist die Frage offen, wie weit natives Membranprotein abdialysiert. Emmelot stellte in seinen Untersuchungen fest, daß von einer Membransuspension in 0,9%iger NaCl-Lösung im Durchschnitt 26% Proteine abgelöst werden können. Er vermutete allerdings, daß es sich dabei um während der Präparation adsorbiertes Protein handeln könnte (P. Emmelot et al., 1964).

Aufgrund der vorgenannten Untersuchungen muß der Phalloidinrezeptor ein nichtlipidhaltiger Membranbestandteil sein. Mit diesen Membranbestandteilen ergibt Phalloidin ein Spektrum, das sich sowohl von dem Spektrum des Substanzgemisches als auch von dem des Phalloidins unterscheidet. Dieses Spektrum weist auf die Entstehung einer Additionsverbindung hin. Die Extinktion des gemessenen Differenzspektrums von Phalloidin und dem Substanzgemisch (L_1) nimmt mit zeitlich abhängiger Inkubation zu. Die Wirksamkeit des Harnstoffs weist darauf hin, daß vielleicht Wasserstoffbrücken oder Schwefelgruppen an der Bildung des Differenzspektrums von Phalloidin und dem Substanzgemisch (L_1) beteiligt sein könnten. Harnstoff kann die Wasserstoffbrücken trennen und Merkaptidbindungen reduzieren (K. Wallenfels u. Ch. Treffer, 1964; H. Netter, 1959).

Bei früheren Untersuchungen wurde die Schutzwirkung von "schwefelhaltigen Verbindungen", gemessen an der Kaliumfreisetzung der phalloidinvergifteten, isoliert perfundierten Rattenleber, diskutiert. Die Befunde deuten daraufhin, daß schwefelhaltige Membranstrukturen am molekularen Mechanismus beteiligt sein müssen (G. Weil, 1969). Eine Bestätigung dieser Vermutung zeigten Versuche mit p-Chlormercuribenzoat und Substanzgemisch L_1 . Nach Vorinkubation mit p-CMB konnte die Bildung des typischen Differenzspektrums verhindert werden.

p-CMB reagiert auch mit Imidazol- und -Aminogruppen, aber SG-Gruppen werden bevorzugt (G. Gundlach et al., 1959; G. R. Stark et al., 1961). EDTA hatte keinen Einfluß auf die Bindung von p-CMB, die stärker ist als die Komplexbindungskonstante von EDTA und SH-Gruppen; nach EDTA-Zugabe wäre sonst das Differenzspektrum entstanden.

Neuraminsäurehaltige Membranbestandteile werden als Rezeptoren für Pharmaka und Gifte diskutiert (G. Uhlenbruck, 1967). Es gibt verschiedene Neuraminidasen, die substratspezifisch die glykosidische Bindung von Neuraminsäuren hydrolysieren (P.M. Kraemer, 1968).

In unseren Versuchen wurde nur die Wirksamkeit der N-acetylneuraminsäure geprüft.

Weiterhin wurde die Wirkung des Trypsins geprüft. Trypsin spaltet die Peptidbindungen dort, wo die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin vorkommen und zwar so, daß die Carboxylgruppe der Aminosäuren freigesetzt wird (H. Fasold u. G. Gundlach, 1962). Unsere Befunde mit Trypsin lassen vermuten, daß eine Polypeptidstruktur für die Bildung des Differenzspektrums wahrscheinlich nicht notwendig ist.

Es ist bekannt, daß β -Amanitin und Phalloidin eine kovalente Bindung mit Rinderserumalbumin eingehen können (W. Boehringer, 1959; Th. Wieland et al., 1969).

Da die Frage unklar ist, wie weit es sich bei unserem abdialysierten Protein um Membransubstanz handelt, wurde geprüft, ob die typischen Differenzspektren auch nach Einwirkung von Phalloidin auf Albumin entstehen. Das gemessene Differenzspektrum mit Rinder-serumalbumin und Phalloidin ist mit denen von L_2 und L_3 vergleichbar, jedoch nicht mit dem von L_1 . Ein weiterer Unterschied liegt in der zeitlichen Abhängigkeit des Differenzspektrums; es stellt sich rasch ein Gleichgewicht ein.

Zusammenfassend kann man sagen, daß der Bindungsort des Phalloidins nicht die Lipidkomponente der Plasmamembran, sondern ein nichtlipidhaltiger Bestandteil, wahrscheinlich das Protein, sein muß.

Zusammenfassung

1. Aus Rattenleberzellmembranen wurden in Anlehnung an die Methode nach Coleman Plasmamembranen unter enzymatischer und elektronenmikroskopischer Kontrolle isoliert.
2. Phalloidin bewirkte keine Hemmung der Enzyme des aktiven Kationentransportes in frischen Membranen. An dialysierten Membranen konnte teilweise eine Hemmwirkung festgestellt werden.
3. Aus Membranen wurden Lipide und nichtlipidhaltige Membranfraktionen abgetrennt.
4. Eine Bindung von Phalloidin an Plasmamembranlipidextrakt konnte in den vorliegenden Versuchen nicht nachgewiesen werden.
5. Die nichtlipidhaltigen Membranbestandteile konnten elektrophoretisch untersucht und mit einigen Methoden chemisch-analytisch charakterisiert werden.
6. Phalloidin trat in Wechselwirkung mit den nichtlipidhaltigen Membranbestandteilen; der Nachweis wurde mit Hilfe von Differenzspektren geführt. Die entstandenen Differenzspektren waren nach Einwirkung von Harnstoff reversibel. N-acetylneuraminidase hatte keinen Einfluß, Trypsin beeinflusste das Entstehen eines Differenzspektrums nur geringfügig. Nach Vorbehandlung mit p-Chlormercuribenzoat konnte die Bildung eines Differenzspektrums mit Phalloidin verhindert werden.

Literaturverzeichnis

- BENEDETTI, E.L. u. P. EMMELOT: Studies on plasma membranes. IV. The ultrastructural localisation and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver. J. Cell. Sci. 2, 499 (1967)
- BOEHRINGER, W: Inaugural-Dissertation, Frankfurt/M. (1959)
- BOYER, J.D.: Spectrometric study of the reaction of proteinsulfhydroxyl groups with organic mercurials. J. Am. Chem. Society 76, 4331 (1960)
- BRUCE, N.A. u. D.T. DUBIN: The role of polyamines in the neutralisation of bacteriophage deoxyribonucleic acid. J. Biol. Chem. 235, 769 (1969)
- BURTON, K: The reaction between the synthesis of DNA and the synthesis of protein in the multiplication of bacteriophage T₂. Biochem. J. 61, 473 (1955)
- BURTON, K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamin reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315 (1956)
- CERIOTTI, G: Determination of nucleic acids in animal tissues. J. Biol. Chem. 214, 59 (1955)
- COLEMAN, R., R.A. MICHELL, J.B. FINEAU u. J.B. HAWTHORNE: A purified plasma membrane fraction isolated from rat liver under isotonic conditions. Biochem. Biophys. Acta 135, 573 (1967)

- DECKEN, A. v.d., H. LOEW u. T. HULTIN: Über die primären Wirkungen von Phalloidin in Leberzellen. Biochem. Z. 332, 503 (1960)
- EMMELOT, P. u. C.J. BOS: Adenosine triphosphatase in the cell-membrane fraction from rat liver. Biochem. Biophys. Acta 58, 374 (1962)
- EMMELOT, P., C.J. BOS, E.L. BENEDETTI u. PH. RÜMKE: Studies on plasma membranes. I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochem. Biophys. Acta 90, 126 (1964)
- EMMELOT, P. u. C.J. BOS: Studies on plasma membranes. II. K^+ -dependent p-nitrophenyl phosphatase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochem. Biophys. Acta 121, 375 (1966)
- EMMELOT, P. u. C.J. BOS: Studies on plasma membranes. III. Mg^{++} -ATPase, $(Na^+-K^+-Mg^{++})$ -ATPase and 5'-nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver. Biochem. Biophys. Acta 120, 369 (1966)
- FAIN, J.N.: Effect of K^+ , valinomycin, tetraphenylbromate and ouabain on lipolysis by white fat cells. Molec. Pharm. 4, 339 (1968)
- FASOLD, H. u. G. GUNDLACH: in: Methoden der enzymatischen Analyse (herausgegeben von H.U. Bergmeyer), Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße, p. 350 (1962)
- FIUME, L. u. R. LASCHI: Lesioni ultrastrutturali prodotte nelle cellule parenchimali eratiche dalle falloidina e dalla α -amanitina. Sperimentale 115, 288 (1965)

- FOLCH, J., M. LEES u. G.H. SLOANE STANLEY: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497 (1957)
- FOLIN, O. u. V. CIOCALTEU: On tyrosine and tryptophane determination in proteins. J. Biol. Chem. 73, 627 (1927)
- FRIMMER, M., J. GRIES, D. HEGNER u. B. SCHNORR:
Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Phalloidins. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path., 258, 197 (1967)
- FRIMMER, M., G. WALDVOGEL u. G. WEIL: Schutzwirkung von Thicotsäure gegen K^+ -freisetzende Wirkung des Phalloidins an der isoliert perfundierten Rattenleber. Klin. Wschr. 46, 1288 (1968)
- FRIMMER, M., H. GLOSSMANN, D. HEGNER, B. SCHNORR u. H. PUCHINGER: (in Vorbereitung)
- FRIMMER, M. u. G. WEIL: Influence of tetraethylammonium (TEA^+), SH-compounds and insulin on the K^+ -release of phalloidin-poisoned rat liver. Europ. J. Pharm. 8, 240 (1969)
- FROMMHERZ, H.: Inaugural-Dissertation, Marburg/Lahn (1969)
- GIANETTO, R. u. C. DE DUVE: Tissue fraction studies. 4. Comparative study of the binding of acid phosphatase, β -glucuronidase and cathepsin by rat liver particles. Biochem. J. 59, 433 (1955)
- GIELEN, W. u. G. UHLENBRUCK: Neuraminsäure als Bestandteil von Membranbausteinen. Hoppe-Seyler's Zeitschr. Phys. Chem. 349, 1245 (1968)

- GOTTSCHALK, A.: in: The Enzymes, Academic Press,
New York and London, 4, 470 (1960)
- GRIES, J., M. FRIMMER, D. HEGNER u. H. GLOSSMANN:
Störungen der Kationenpermeabilität von
Leberzellmembranen durch Phalloidin. Naunyn-
Schmiedebergs Arch. Pharm. exp. Path. 260,
125 (1968)
- GUNDLACH, G., W.H. STEIN u. S. MOORE: The nature of
the amino acid residues involved in the
inactivation of ribonuclease by iodacetate.
J. Biol. Chem. 234, 1754 (1959)
- HARPER, A.E.: in: Methoden der enzymatischen Analyse
(herausgegeben von H.U. Bergmeyer), Verlag
Chemie, Weinheim/Bergstraße, p. 778 (1962)
- HEGNER, D., F. LUTZ, V. ECKERMANN, J. GRIES u.
B. SCHNORR: Effect of phalloidin on
 Mg^{++} -ATPase, $(Na^{+}-K^{+})$ -ATPase and K^{+} -depen-
dent p-nitrophenylphosphatase activity of
plasma membranes isolated from rat liver.
Biochem. Pharm. 18, 1 (1969)
- HESS, B.: Über die Hemmung der oxydativen Phosphory-
lierung durch Phalloidin auf der Cytochrom-
Stufe. Biochem. J. 328, 325 (1956)
- HILLE, B.: The selective inhibition of delayed
potassium currents in nerve by tetraethyl-
ammonium ions. J. Gen. Physiol. 50, 1287
(1967)
- IVANOV, V.T., J.A. LAINE, N.D. ABDULAEV, L.B. SENYAVINA,
E.M. POPOV, YU.A. OVCHINNILOV u. M.M. SHEMA-
KIN: The physicochemical basis of the func-
tioning of biological membranes: The conformation
of valinomycin and its K^{+} -complex in solution.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 803 (1969)

- JACOBS, S.T., E.M. SAJDEL, H.N. MUNRO: Specific action of -amanitin on mammalian RNA polymerase protein. *Nature* 225, 60 (1970)
- KABAT, E.A. u. M.M. MAYERS: Carbohydratate estimation, in: *Experimental Immunochemistry*, Capt. 22, 2. Edition Thomas, Springfield/Illinois (1964)
- KRAEMER, P.M.: Cytotoxic, haemolytic and phospholipase contaminants of commercial neuraminidases. *Biochem. Biophys. Acta* 167, 205 (1968)
- LANSING, A.J., M.C. BELKHADE, W.E. LYNCH u. J. LIEBERMANN: Enzyme of plasma membranes of liver. *J. Biol. Chem.* 242, 1772 (1967)
- LIEBOLD, B. u. G. BRAUNITZER: Über Haemoglobin. II. Die tryptische Spaltung des Humanglobins A. Hoppe Seyler's *Z. Phys. Chem.* 315, 271 (1959)
- LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR u. R.J. RANDALL: Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951)
- LYNEN, F. u. U. WIELAND: Über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes IV. *Liebigs Ann. Chem.* 553, 93 (1938)
- MATSCHINSKY, F., U. MEYER u. O. WIELAND: Die Wirkung des Knollenblätterpilzgiftes Phalloidin auf die isolierte Rattenleber. *Biochem. Z.* 333, 48 (1960)
- MATSCHINSKY, F. u. O. WIELAND: Serumveränderungen bei experimenteller Phalloidinvergiftung. *Z. Ges. Physiol.* 215, 5 (1960)
- MATSCHINSKY, F. u. O. WIELAND: Über Serumveränderungen und Störungen der Mitochondrienfunktionen bei experimenteller Phalloidinvergiftung. *Biochem. Z.* 333, 33 (1960)

- MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese, Verlag: Walter de Gruyter u. Co., Berlin (1968)
- MICHELL, R.H. u. J.N. HAWTHORNE: The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 333 (1965)
- MILLER, F. u. O. WIELAND: Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Leber von Maus und Ratte bei akuter Phalloidinvergiftung. Virchows Arch. path. Anat. 342, 83 (1967)
- MOORE, S. u. W.H. STEIN: A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J. Biol. Chem. 211, 907 (1954)
- MÜNCH, H.: Über die Knollenblätterschwammvergiftung. Klin. Wschr. III. Jhrg. 2. Halbjahr (1965)
- NETTER, H.: in: Theoretische Biochemie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, p. 350/352 (1959)
- PARSONS, R.L.: Mechanism of neuromuscular blockade by tetraethylammonium. Am. J. Physiol. 216, 925 (1969)
- PAULET, G.: Traité des champignons, 2. Paris (1808)
- PENNINGTON, M., L.K. STEINRAUF u. PH. DAWKINS: Molecular structure and some transport properties of valinomycin. Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 515 (1969)
- PRESSMANN, B.C.: Inophorus antibiotics as models for biological transport. Fed. Proc. 27, 1283 (1968)
- REALE, E. u. L. LUCIANO: Histochemische Reaktion und "negativ-staining" von Zellfraktionen. I. Untersuchungen der sauren Phosphatase in den Milzlysosomen. Histochemie 11, 296 (1967)

- STARK, G.R., W.H. STEIN u. S. MOORE: Relationships between the conformation of ribonuclease and its reactivity toward iodacetate. J. Biol. Chem. 236, 436 (1961)
- SVENNERHOLM, L.: Quantitative estimation of sialic acids, II. A colorimetric resorcinol-hydrochlorid acid method. Biochem. Biophys. Acta 24, 604 (1957)
- UHLENBRUCK, G., G. WINTZER u. R. WENSDORFER: Studien über den Aufbau der Zellmembran, insbesondere derjenigen des roten Blutkörperchens. Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 5, 281 (1967)
- WALLFEN FELS, K. u. CH. TREFFER: Chemische Reaktivität von Proteinen, in: Mechanismen enzymatischer Reaktionen. Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, p. 6 (1964)
- WALLENFELS, K., B. MÜLLER-HILL, D. DABISCH, CH. TREFFER, u. R. WEIL: Untersuchungen an milchzuckerspaltenden Enzymen. XVI. Zahl und Reaktivität der SH-Gruppen der β -Galaktosidase. Biochem. Z. 340, 41 (1964)
- WEIL, G: Inaugural-Dissertation, Gießen (1969)
- WIELAND, O.: Changes in liver metabolism induced by poisons of Amanita phalloides. Clin. Chem. 11, 323 (1965)
- WIELAND, TH. u. K. DOSE: Veränderungen der Proteinverteilung im Blutserum bei Amanitinvergiftung. Biochem. Z. 325, 439 (1954)
- WIELAND, TH. u. K. DOSE: Zur Biochemie der Knollenblätterpilzvergiftung. Biochem. Z. 327, 343 (1956)

- WIELAND, TH. u. O. WIELAND: Chemistry and toxicology of toxins of *Amanita phalloides*. Pharmacol. Reviews 11, 87 (1959)
- WIELAND, TH.: The toxic peptides of *Amanita phalloides*. Fortschr. der Chemie organ. Naturstoffe 25, 214 (1967)
- WIELAND, TH., G. LÜBEN, H. OTTENHEYM, J. FAESEL, J. DE VRIES, W. KONZ u. J. SCHMID: Antamid. Seine Entdeckung, Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese. Angew. Chemie 80, 209 (1968)
- WIELAND, TH: Poisons principles of mushrooms of the genus *amanita*. Science 195, 946 (1968)
- WIELAND, TH: A conjugate of phalloidin with bovine serum albumin. Febs. Letters 4, 341 (1969)
- WIPF, K.-H. u. W. SIMON: Selective K^+ -transport through synthetic in a potential gradient. Biochem. Biophys. Res. Comm. 34, 707 (1969)
- WOODIN, A.M. u. A.A. WIENECKE: Role of leucocidin and triphosphoinositide in the control of permeability. Nature 20, 283 (1968)

Herrn Priv. Doz. Dr. D. Hegner danke ich für
seine Anregungen bei der Planung und Auswertung
der Versuche.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. B. Schnorr für
die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Lebenslauf

Am 24. 9. 1941 wurde ich als Sohn des Regierungsamtmanns Wilhelm Eckermann und seiner Ehefrau Hanna, geb. Franke, in Kassel geboren.

Meine Schulzeit in Fulda beendete ich am 3. März 1961 mit dem Abitur. Danach leistete ich zunächst einen eineinhalbjährigen Wehrdienst ab.

Im Wintersemester 1962/63 begann ich das Studium an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus Liebig-Universität, Gießen. Am 18. 7. 1967 bestand ich die Tierärztliche Prüfung.

In der Zeit von Februar 1965 bis März 1966 war ich als Wissenschaftliche Hilfskraft an der Ambulatorischen und Geburtshilflichen Veterinärklinik, Gießen, tätig. Nach einer halbjährigen Veterinärpraktikantenzeit erhielt ich am 28. 2. 1968 meine Approbation als Tierarzt. Seit September 1968 bin ich am Institut für Pharmakologie und Toxikologie an der Veterinärmedizinischen Fakultät, Gießen, mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

FOTO-DRUCK LENZ · 63 Gießen · Riegelpfad 32/Ecke Ludwigstraße
Telefon 0641-77449